ÜBER
DIE «GRANULÄRE» FORM
DES TUBERKULOSEVIRUS

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT BASEL

ACAD.
LUGD.BAT.
BIBL.

VORGELEGT VON

ABRAHAM MEDWEDEFF
AUS CHERSON (RUSSLAND)

BASEL
FRIEDRICH REINHARDT, UNIVERSITÄTS-BUCHDRUCKEREI
1914

ÜBER
DIE «GRANULÄRE» FORM
DES TUBERKULOSEVIRUS

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT BASEL

ACAD.
LUGD. BAT.
BIBL.

VORGELEGT VON

ABRAHAM MEDWEDEFF
AUS CHERSON (RUSSLAND)

BASEL
FRIEDRICH REINHARDT, UNIVERSITÄTS-BUCHDRUCKEREI
1914

VON DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER
UNIVERSITÄT BASEL GENEHMIGT
AUF ANTRAG

VON

PROF. DR. R. STÄHELIN

Meinem lieben Vater

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546707_0046

Einleitung.

Seit der Entdeckung des Tuberkuloseerregers durch R. Koch im Jahre 1882, schien die wichtigste Aufgabe der Tuberkuloseforschung gelöst zu sein. Die eigentümliche Färbbarkeit des Tuberkelbacillus, auf welche Koch selbst hingewiesen hat, ermöglichte nun seinen Nachweis in tuberkulösem Material. — Es gelang aber trotz des leistungsfähigsten Verfahrens nicht immer, den Bacillus sichtbar zu machen. Dieser Uebelstand konnte nicht als belanglos gelten, da die sichere Auffindung des Bacillus als unerlässliche Forderung der Diagnostizierung der Tuberkulose erkannt wurde. Demnach ist es nun ganz verständlich, wenn zahlreiche Forscher in der richtigen Erkenntnis dieses tatsächlichen Bedürfnisses sich mit der Verbesserung der von Koch angegebenen Färbemethode, sowie der Erfindung von neuen Methoden befasst haben. So entstand eine grosse Zahl von Färbemethoden, die dem Uebelstande zwar halfen, ihn jedoch nicht ganz zu beheben vermochten.

Auf diesem Gebiete war allmählich Ruhe eingetreten, bis die Behauptung Much's im Jahre 1907, er hätte eine besondere granuläre Form des Tuberkulosevirus entdeckt, die allgemeine Aufmerksamkeit von neuem auf die Frage nach dem Fehlen des Tuberkelbacillus in sicher tuberkulösem Material lenkte.

Die « granuläre » Form des Tuberkulosevirus wurde von Much im Behring'schen Institute im Jahre 1907 entdeckt. Als Material für die Untersuchungen dienten Much Lungen der tuberkulösinfizierten Rinder und Schafe, Eiter aus kalten Abscessen von Menschen und Milch von stark tuberkulösen Kühen. Nach Ziehl-Neelsen gefärbt, erwies sich das gesamte Material trotz der sorgfältigsten Untersuchung meist von Tuberkelbacillen frei, die prolongierte Färbung nach Gram liess dagegen feine granulierte Stäbchen, zu Stäbchenform angeordnete Körnchenreihen und feinste, unregelmässig zu zwei oder

einzeln liegende Granula erkennen. Die Körnchen stellten runde, mitunter auch ovale, scharf kontourierte Gebilde dar. Sie waren von wechselnder Grösse, vom Aussehen von feinsten Kokken und meist schwarz bis schwarzviolett gefärbt. Bei optimalen Lebensbedingungen liessen sich die Granula in säurefeste Stäbchen umwandeln, und umgekehrt entstanden aus letzteren die Granula, sobald die Lebensbedingungen ungünstig waren.

Zur Darstellung der nach Ziehl nicht färbbaren neuentdeckten Form des Tuberkulosevirus wurden von Much (75) folgende drei Modifikationen der Gram-Methode empfohlen:

a) Gram-Methode I.

1. Färben in Anilinwassergentianaviolett während 24—48 Stunden bei 37°.
2. Fixieren des Farbstoffes mit Lugol'scher Lösung 5—10 Minuten.
3. Entfärben in Alkohol absolutus und Nelkenöl.

b) Gram-Methode II.

1. Färben in MethylviolettBNlösung (10 ccm. gesättigter alkoholischer MethylviolettBNlösung in 100 ccm 2% Karbolwasser) während 24—48 Stunden bei 37° oder Aufkochen über der Flamme.
2. Die Lugol'sche Lösung 5 Min. einwirken lassen.
3. Entfärben in 5% Salpetersäure 1 Minute, in 3% Salzsäure 10 Sekunden und endlich in einer Mischung von Aceton und Alkohol absolutus zu gleichen Teilen.

Gram-Methode III.

1. Färben während 24—48 Stunden bei 37° in Methylviolettlösung, wie unter *b*, oder Aufkochen über der Flamme.
2. Jodkaliumwasserstoffsuperoxydlösung (5 gr Jodkalium, 100 ccm 2% H_2O_2) ungefähr 2 Min. einwirken lassen.
3. Entfärben in Alkohol absolutus.

Mit Hilfe dieser drei Methoden konnte Much in den meisten Fällen mit Sicherheit die Tuberkulose diagnostizieren, und jedes Mal bestätigte der Tierversuch seine Annahme. Nach einer

Reihe von Untersuchungen kam der Autor zu folgenden Schlüssen:

1. Es gibt eine nach Ziehl nicht darstellbare granuläre Form des Tuberkulosevirus.
2. Diese granuläre Form ist virulent.
3. Sie kann in tuberkulösen Organen vorkommen als einzig färberisch nachweisbare Manifestation des Tuberkel verursachenden Agens.
4. Sie kann auch vergesellschaftet sein mit einer feinen Stäbchenform, die ebenfalls nicht nach Ziehl darstellbar ist.
5. Es gibt Uebergänge von der nur nach Gram färbbaren Granulaform zu der feinen nur nach Gram färbbaren Stäbchenform und weiter zu den auch nach Ziehl färbbaren Stäbchen (und Körnchen).

Das verschiedene Verhalten dieser Formen den Farbstoffen gegenüber erklärt Much damit, dass im Tuberkelbacillus zwei Substanzen vorhanden sind: eine säurefeste, welche sich nach Ziehl färbt, und eine andere, welche diese Eigenschaft nicht besitzt und deshalb vorläufig nur mit Hilfe der modifizierten Gram-Methode zur Darstellung gebracht werden kann.

Um den Pleomorphismus des Bacillus zu erklären, sucht Much (76) schematisch die Etappen, welche der Koch'sche Bacillus im infizierten Organismus durchmacht, darzustellen: Im verkästen, von der Ernährung abgeschnittenen tuberkulösen Gewebe wird die Säurefestigkeit beeinträchtigt, der Bacillus zerfällt dann in nur nach Gram färbbare Körnchenreihen und freie Körner. Gelangen diese in die Zirkulation oder gesundes Gewebe, so entwickeln sich aus ihnen die feinen, nur nach Gram färbbaren Stäbchen. Diese Stäbchen imprägnieren sich dann mit einer Fettsäuresubstanz, werden dadurch säurefest und bestehen als solche oder zerfallen wieder in die granuläre Form.

Das verhältnismässig seltene Vorkommen der «granulären» Form im tuberkulösen Material des Menschen erklärt Much damit, dass der Tuberkelbacillus des Menschen ein abgeschwächtes Virus ist. Um seine volle Virulenz zu entfalten,

imprägniert er sich reichlich mit Fettsäuresubstanzen, dagegen braucht hoch virulentes Virus beim Rinde keine säurefeste Hülle und persistiert deshalb als Granula.

Die Much'schen Untersuchungen warfen einiges Licht auf die dunkle Frage nach dem Fehlen der Tuberkelbacillen in tuberkulösem Material. Es lag nun nahe, die daraus resultierenden Befunde der Nachprüfung zu unterziehen, um eventuell eine neue Bahn der Tuberkuloseforschung zu schaffen. Eine ganze Reihe von Forschern prüfte die Much'schen Befunde nach; die Ergebnisse der darüber angestellten Versuche waren geradezu entgegengesetzt.

So haben v. Behring (8), Michaelides (74), Wirths (116), Schottmüller (97), Fontès (34), Weihrauch (112), Wehrli und Knoll (111), Weiss (113), Wolff (118), Schultz (99), Geipel (40), Caan (20), Treuholz (107), Deyeke (27), Adam (1), Leschke (62), Frei (35), Pekanovitsch (88), Constantini (21), Matson (72) und Körber (59) die Existenz der granulären Form bestätigt.

Hingegen erkannte Fuchs-Wolfring (36) — Schülerin von Spengler — in den Much'schen Granulis die Spengler'schen Splitter, da sie dieselben Eigenschaften besitzen wie die Splitter. Ihr schlossen sich v. Betegh (11) und Kirchenstein (51) später an.

Much (78) wies die Prioritätsansprüche von Davos ab, indem er die mangelhafte Resistenz seiner Granula als Unterschied zwischen diesen und den Splittern betonte.

Einen besonderen Standpunkt nahm Liebermeister (65) an, indem er erklärte, die Granula seien Bestandteile des Bacillus, da auch andere Bakterien Granula in ihrem Innern aufweisen. Derselben Meinung ist auch Krylow (61).

Eine andere Frage, welche ebenfalls zu durchaus widersprechenden Lösungen führte, war die, ob die Granula eine

Entwicklungsform oder ein *Zerfallsprodukt* des Bacillus darstellen. — Nach Wirths (116) sind die Granula entwicklungsfähige virulente Gebilde, da er ihre Umwandlung in säurefeste Stäbchen experimentell nachweisen konnte. Seiner Meinung schliessen sich Schottmüller (97), Weiss (113), Treuholz (107), Deycke (27), Knoll (53), Lichtenhahn (64), Adam (1) und Galli-Valerio (37) an.

v, Behring (8), Schultz (99), Aronson (3), Eisenberg (30), Böhm (17) und Constantini (21) halten dagegen die Granula für Zerfallsprodukte, weil diese Gebilde in älteren tuberkulösen Herden und bei langdauernden Prozessen vorkommen. — Aus demselben Grunde hält sie Geipel (40) für Degenerationsformen des Tuberkelbacillus.

Nach Pekanovitsch (88) sind die Granula weder Entwicklungsform noch Zerfallsprodukt; sie stellen eine besondere vegetative Form des Bacillus dar. — Deycke (27) ist geneigt, jedoch ohne es zu behaupten, anzunehmen, die Granula seien «die primitive Urform des Tuberkelbacillus, aus der sich der säurefeste Bacillus phylogenetisch entwickelt hat.»

Um der Tatsache, dass die Granula entwicklungsfähig sind, gerecht zu werden, halten zwar Schultz (99), Rosenblat, St. (93), Sciallero und Marzagalli (100) und Rosenblatt (94) die Granula für Zerfallsprodukte, sprechen ihnen aber die Regenerationsfähigkeit zu den säurefesten Stäbchen nicht ab.

Much (76) selbst will keine Entscheidung in dieser Frage treffen, glaubt aber nicht, dass die von ihm entdeckten Granula Zerfallsprodukte des Bacillus seien, da sie hoch virulente Gebilde darstellen.

Was nun die Frage nach der *diagnostischen Bedeutung* der «granulären» Form anbelangt, so gehen auch darüber die Meinungen auseinander. Es ist bemerkenswert, dass die meisten Forscher, welche die Gram-Methode in der Much'schen Modifikation dort zu Rate zogen, wo Ziehl versagte, sich in dem Sinne aussprechen, dass die freien Einzelkörner und die in staubförmiger Verteilung liegenden keinen diagnostischen Wert

haben, da sie sehr leicht zu Verwechslung mit anderen grampositiven Keimen, Farbstoffniederschlägen und sonstigen Verunreinigungen Anlass geben können. So wollen Liebermeister (65), Adam (1), Eisenberg (30), Lichtenhahn (64), Teleman (106), Krylow (61), Marmann (69), Neumann und Matson (83) und Löffelmann (67) nur dann die Granula diagnostisch verwerten, wenn sie in Reihen angeordnet sind und somit den Stäbchenverband erkennen lassen.

Aronson (3), Dold (29) und Kayser (49) verhalten sich auch den letzten gegenüber sehr skeptisch, und Böhm will überhaupt vom diagnostischen Werte der Granula nichts wissen, da ihre selbständige Infektionsfähigkeit nicht bewiesen ist.

Wirths (116), Herman (47), Weiss (113), Schultz (99) und Rosenblat, St. (93) sprechen sich dagegen für einen absoluten diagnostischen Wert der Granula aus, da es bei einiger Uebung sehr leicht gelingt, die einzel- und im Haufen liegenden Granula von den Farbstoffniederschlägen, anderen Bakterien und Kokken zu unterscheiden.

Um die Verwechslung der Granula mit den grampositiven Keimen zu vermeiden, um die Verunreinigungen auszuschliessen, schlagen Telemann (106), Adam (1), Knoll (56), Matson (72), Frei (35), Körber (59) und Löffelmann (67) die vorherige Behandlung des Materials mit Antiformin vor, da dasselbe alle Bakterien und Kokken, sowie sonstige Verunreinigungen auflöst, aber nicht imstande ist, die widerstandsfähigen Granula des Tuberkulosevirus anzugreifen. — Weihrauch (112) und Kayser (49) warnen jedoch vor allzugrosser Sicherheit, weil nicht alle Kokken sich in Antiformin auflösen. — Körber (59) meint: Antiformin schliesst zwar die Möglichkeit der Verwechslung der Granula mit den Kokken aus, aber nicht mit Niederschlägen.

Much (79) sieht im Antiformin ein wertvolles Mittel zur Sicherung der Diagnose in zweifelhaften Fällen. Auch ist es sehr leicht, die isolierten Granula und Granulahaufen von Niederschlägen und anthrakotischem Pigment zu unterscheiden;

derjenige, dem es nicht gelingt, soll sehr alte Tuberkelbacillenreinkulturen färben, denn «die darin erkannten Gebilde sind nachher mit Sicherheit mit den . . . . isolierten Granulis und Granulahaufen zu identifizieren und von Pigment oder dergleichen mit Sicherheit zu unterscheiden.»

Der zweifelhafte differenzial-diagnostische Wert der Granula musste selbstverständlich bei den meisten Forschern Bedenken über die Zuverlässigkeit der modifizierten Gram-Methode erwecken. Demnach ist es nun ganz verständlich, wenn sie sich in dem Sinne aussprechen, dass die Gram-Methode nicht allein für die Diagnose der Tuberkulose massgebend sein soll, sondern stets suche man die Diagnose mit anderen vollwertigen Methoden zu sichern. Die andern Autoren sehen sich dagegen veranlasst, die Selbständigkeit der Methode trotz ihrer Fehler und schwierigen Technik anzuerkennen, da sie doch allein zum Nachweis der granulären Form führt. — Nach Schottmüller (97) würde die Gram-Methode bei der Untersuchung der Flüssigkeiten der Körperhöhlen (pleuritischen Exsudaten, Spinalflüssigkeit und Harn) sogar gute Dienste leisten, da bei diesen die Verwechslungsmöglichkeit mit anderen Mikroorganismen beinahe ausgeschlossen ist. — Auch Hermann (47) will im allgemeinen die Vorteile der Gram-Methode in der Much'schen Modifikation anerkennen: mit ihr bekommt man mehr Virus zu Gesicht als mit der Ziehl-schen, und ausserdem sind die Granula nach Ziehl überhaupt nicht färbbar. Dagegen hat die Gram-Methode keine Vorteile vor der seinigen, sondern umgekehrt. Mit dieser Methode sollen noch dort typische Tuberkelbacillen nachzuweisen sein, wo Ziehl überhaupt negativ ausfällt und Gram nur die granuläre Form zur Darstellung bringt. Die Herman-Methode, welche ursprünglich für Schnitte bestimmt war, arbeitet mit einem Gemisch von

a) Kristallviolettlösung (1 gr Kristallviolett in 20 ccm Alkohol) und
b) Ammoniumkarbonatlösung (1 gr Ammoniumkarbonat in 100 ccm destill. Wasser).

Beide werden im Verhältnis 1 : 3 gründlich gemischt. Die Färbung geschieht über dem Wasserbade so lange, bis Dämpfe abgehen, und ist nach einer Minute fertig. Man entfärbt das Präparat in 10% Salpetersäure einige Sekunden, dann in 95% Alkohol so lange, bis eine blassblaue Farbe auftritt. Nachher wird das Präparat unter Wasserleitung und mit destilliertem Wasser gründlich ausgewaschen, worauf der Farbenton wiederkehren soll. Für die Gegenfärbung, welche Herman nicht für nötig hält, eignet sich 1% Eosinlösung. Schliesslich wird das Präparat über dem Wasserbade getrocknet und in Canadabalsam eingebettet. Diese Methode wurde von Herman bereits im Jahre 1890 in einem Falle von Tuberkulose des Kalbes, wo alle Methoden versagten, mit Erfolg angewandt. Sie wurde aber bald vergessen, und als dann Much seine Befunde veröffentlichte, prüfte Herman die Gram-Methode nach und kam zum Schlusse, dass seine eigene mehr als diese leistet. Deshalb empfahl sie Herman wieder. Die Herman-Methode wurde von Caan (20), Berka (10) und Kayser (49) nachgeprüft und ergab sehr befriedigende Resultate.

Zur Darstellung der nach Gram und nach Ziehl, bezw. der Uebergänge von den nach Gram zu den nach Ziehl färbbaren Formen des Tuberkulosevirus wurden von Weiss (114), Knoll (56) und Hatano (45) drei verschiedene Methoden der Doppelfärbung angegeben. Die geläufigste ist die Knoll-Methode. Ihre Technik mit einigen späteren Modifikationen, die von Knoll selbst gemacht wurden, ist folgende:

Stammlösung A. — Methylviolett (konzentrierte alkoholische Lösung). Stammlösung B. — Fuchsin (ebenfalls gesättigte alkoholische Lösung).

1. Stammlösung B. — 1 ccm auf 10 ccm einer 3% Resorcinlösung.
2. Hinzufügen von Stammlösung A, bis die Farbe auf Fliesspapier einen Fleck mit violettem Zentrum und hellrotem Saume aufweist.
3. Färben über der Flamme, bis Dämpfe abgehen, 5 Minuten lang, die letzte ½ Minute, bis Blasen springen, oder kalt während 24 Stunden.

4. Jodieren mit Jodkaliumwasserstoffsuperoxydlösung (5 gr Jodkalium, 66 ccm 3% H_2O_2 und 34 ccm Wasser) oder mit Lugol'scher Lösung.
5. Differenzieren in 2% Salzsäure-Alkohol (70% Alkohol).
6. Entfärben in Aceton pur., bis das Präparat rot erscheint.
7. Entfernen des Acetons mit Alkohol absol.
8. Lufttrocknen. Bei Schnitten folgt noch das Ueberführen durch Xylol in Canadabalsam.

Da die Farbenmischung nur wenige Tage haltbar ist, empfiehlt Knoll dieselbe gebrauchsfertig in Gelatinekapseln aus Grübler's Laboratorium in Leipzig zu beziehen. Der Kapselinhalt wird in 4 ccm Alkohol absol. gelöst, und die Lösung wird mit destill. Wasser bis 20 ccm verdünnt. Das Präparat soll bei Anwendung dieser Methode vollkommen frei von Niederschlägen sein.

Much (79) selbst will einstweilen nur mit der modifizierten Gram-Methode gute Resultate erzielt haben. Die Herman-Methode, wenn sie auch mehr Stäbchen als die Ziehl-Methode zu Gesicht bringt, ist zur Darstellung der granulären Form vollständig unbrauchbar. Die Doppelfärbung bringt insofern etwas Neues, als sie die Erkenntnisse, die man mit isolierten Gram- und Ziehlfärbungen gewonnen hat, nun zusammenfassend in einem Bilde zur Darstellung bringt.

Diese Resultate liessen mit aller Wahrscheinlichkeit annehmen, dass das Tuberkulosevirus tatsächlich aus zwei morphologisch verschiedenen Substanzen besteht: einer säurefesten, welche sich nach Ziehl färbt und einer anderen, welche sich nur nach Gram tingiert. Es lag nun nahe, die *chemische Zusammensetzung* der Gramfärbbaren Substanz zu eruieren, und für diesen Zweck wurde eine Reihe von Untersuchungen angestellt. Wirths (117) kam auf Grund seiner Untersuchungen zum Schlusse, dass die nach Gram färbbaren Granula aus Eiweisssubstanzen bestehen, während der Bacillenleib seine Säurefestigkeit dem in ihm vorhandenen Wachs oder Fett verdankt. — Nach Weiss (114) besteht die ziehlfärbbare Substanz aus einer Fettsäure und nicht aus Wachs; die gramfärb-

bare ist zum grössten Teil eine Eiweissubstanz, der noch eine Substanz beigemischt ist. Die letzte soll in Verbindung mit der Grundeiweissubstanz der Granula denselben eine grosse Resistenz, wie sie der Bacillenleib besitzt, gegen die Chemikalien verleihen. — Liebermeister (65) ist geneigt, anzunehmen, dass die Granula aus einer der Gruppe der Nucleoalbumine angehörigen Eiweisssubstanz bestehen; ausserdem enthalten sie noch ein Kohlehydrat und eine Lipoidgruppe. — Rosenblatt St. (93) äussert sich in dem Sinne, dass die Granula auf Kosten der Nucleinsubstanzen des Bacilleninhaltes beim Zerfall des Bacillus gebildet werden. — Deycke (27) ist der Meinung, dass nach Ziehl sich die Fettsäuresubstanz färbt, nach Gram — die Eiweisskörper der Bacillen und ihrer Granula, die mit Neutralfett imprägniert sind. — Much (79) selbst stimmt Deycke vollkommen bei. Das Neutralfett der Granula wird auf Kosten der durch irgendwelche schädigende Einflüsse aufgelösten säurefesten Substanz gebildet. Mit dem Neutralfett imprägniert entgehen die Granula, wie es auch Knoll annimmt, dem Untergange. Bei geeigneten Lebensbedingungen können sie wiederum die säurefeste Substanz regenerieren und anlagern. — Nach Aronson (3) besteht die säurefeste Substanz nicht aus Fettsäure, sondern aus Wachs, welchem ein Fettalkohol beigemischt ist; die Granula verdanken ihre Färbbarkeit einer Fettsubstanz, welche sich mit Trichloräthylen, wie es auch bei der säurefesten Substanz der Fall ist, extrahieren lässt. Zu einer ähnlichen Meinung neigt auch Krylow (61) — Eisenberg (30) schlägt vor, die chemische Benennung der Granulasubstanz vorläufig zu unterlassen und «bis auf weiteres nur rein morphologisch von «Grundsubstanz» und «Granulasubstanz» der Stäbchen zu sprechen (wobei noch zu entscheiden ist, ob es sich bei der letzteren um etwas Einheitliches handelt). . .»

Ueber die *prognostische Bedeutung* des Vorkommens der «granulären» Form im tuberkulösen Material menschlicher Provenienz haben sich nur wenige Forscher ausgesprochen. Die Mehrzahl will keine Schlüsse in Bezug auf diesen Punkt ziehen.

Im allgemeinen wird das Auftreten der Granula als günstiges Symptom aufgefasst. Nach Weiss (113) würde das Vorkommen der Granula für Latenzstadium der Tuberkulose sprechen. — Nach Sciallero und Marzagalli (100) und Böhm (17) werden die Granula bei langsam verlaufenden Prozessen angetroffen. — Knoll (56) will sie dort gesehen haben, wo «schwere allgemeine Erscheinungen zurücktreten und das Leiden anscheinend auf einzelne Herde beschränkt erscheint.» — Neumann und Matson (83) glauben, dass das Vorkommen der Ziehl'schen Stäbchen im Sputum für käsige Veränderungen in der Lunge spricht, das alleinige Vorkommen der granulären Form für fibröse Herde ohne Verkäsung. — Körber (59) weiss nichts über die prognostische Bedeutung der Granula mitzuteilen, da dieselben sich bei seinen Patienten nach einigen Wochen in säurefeste Stäbchen verwandelten. — Gasis (38) will sie bei schweren Fällen der Lungentuberkulose, welche häufig mit Cavernen verbunden sind, angetroffen haben.

So mannigfach nun die über die Entdeckung von Much angestellten Untersuchungen sind, so wenig gestatten sie ein abschliessendes Urteil, so oft und wesentlich differieren, wie es aus der kurzen Literaturübersicht hervorgeht, die aus ihnen gewonnenen Resultate und Schlüsse. Aus diesem Grunde erschien es lohnend, in die nochmalige Prüfung der Much'schen Befunde einzutreten, und auf Veranlassung und unter der Leitung des Herrn Prof. Dr. R. Stähelin unternahm ich in diesem Sinne Untersuchungen an der hiesigen Medizinischen Klinik. Es wurde dabei sowohl auf die Brauchbarkeit der Gram-Färbung in der von Much angegebenen Modifikation für die klinische Untersuchung des menschlichen Materials, als insbesondere darauf Wert gelegt, festzustellen, ob die «granuläre» Form tatsächlich eine besondere Form des Tuberkulosevirus darstellt, oder die Granula als Bestandteile, oder als Zerfallprodukte, oder endlich als Entwicklungsformen des Tuberkelbacillus zu deuten sind.

Eigene Untersuchungen.

Um den Wert einer Färbemethode zu bestimmen, kommt es sehr wesentlich darauf an, sie mit anderen Methoden zu vergleichen. Aus diesem Grunde wurde das sämtliche Material nach vier verschiedenen Methoden gefärbt: Ziehl, Gram in Much'scher Modifikation, Herman und Knoll. Um zu klaren und übersichtlichen Resultaten zu kommen, erschien es notwendig, zunächst durch Vorversuche das Verhalten des bacillenhaltigen Materials den genannten Färbungen gegenüber festzustellen. Es war von vornherein anzunehmen, dass den Untersuchungen am bacillenhaltigen Material andere Verhältnisse zugrunde liegen; jedoch müssten diese Voruntersuchungen wichtige Aufschlüsse über die Leistungsfähigkeit jeder der benützten Methoden, über ihren differenzial-diagnostischen Wert bieten.

Meine Untersuchungen erstreckten sich in erster Linie auf die Sputa der tuberkulösen Kranken der hiesigen Medizinischen Klinik, welche in liebenswürdiger Weise vom Aerztepersonal zu meiner Verfügung gestellt wurden. Es sind im ganzen 44 Proben, von denen 39 von sicher tuberkulösen Patienten stammten. Die Beschaffenheit der übrigen 5 Proben, sowie der klinische Befund liessen zwar bei den betreffenden Patienten Lungentuberkulose vermuten, jedoch blieben die an der Klinik vorgenommenen Untersuchungen auf Tuberkelbacillen erfolglos. Sämtliche Sputa wurden wiederholt in unregelmässigen Zeitabständen auf ihren Bacillengehalt geprüft. Um einwandfreie Resultate bei der Untersuchung der bacillenfreien fünf Proben zu erhalten, wurden zum Kontrollzwecke Sputa der an Bronchitis leidenden Patienten benützt.

Es wurde ferner eine Reihe von Schnitten aus Organen von Meerschweinchen untersucht, welche mit teilweise bacillenhaltigem, teilweise bacillenfreiem tuberkulösen Material geimpft wurden. Die Schnitte, welche in liebenswürdiger Weise vom hiesigen pathologisch-bakteriologischen Institut zu meiner Verfügung gestellt wurden, wurden nach denselben Methoden gefärbt wie die Sputa.

Um festzustellen, inwiefern Much Recht hat, wenn er behauptet, die von ihm entdeckten Granula seien mit den in älteren Tuberkelbacillenreinkulturen vorkommenden Gebilden identisch, wurden auf Kartoffel und schrägem Agar gezüchtete Tuberkelbacillen vom Typus humanus sowie Typus bovinus nach der modifizierten Gram-Methode gefärbt. Um den angeblichen Unterschied der Granula von den Kokken zu ermitteln, wurden Streptokokkenreinkulturen untersucht.

Das Verfahren bei der Untersuchung von Sputis war folgendes: Mit einer Platinöse wurde ein Partikelchen des Sputums entnommen und möglichst gleichmässig in sehr dünner Schicht auf mindestens 6 Objektträger gebracht. Auf diese Weise gelang es, die benützten Färbemethoden unter einigermassen gleichen Verhältnissen zu prüfen. Trotzdem erschien es notwendig, an einem und demselben Präparate Umfärbungen vorzunehmen, da es von vornherein klar war, dass es niemals gelingen kann, in 2 verschiedenen Ausstrichen gleichviel Bacillen zu bekommen. Nach Ziehl-Neelsen wurden die Ausstriche 6—8 Minuten unter Erwärmung mit Karbolfuchsin bis zur Dampfbildung gefärbt; danach wurde das Präparat unter Wasserleitung abgespült und zuerst in 10% Schwefelsäure 20—30 Sekunden, alsdann in 75% Alkohol, bis schwachroter Ton auftrat, entfärbt. Die Gegenfärbung wurde unterlassen, und zwar aus folgenden Gründen: Sind die Bacillen im Präparat in grosser Zahl, so treten sie auf schwachgefärbtem Grunde deutlich hervor; sind sie dagegen in Minderzahl und weit voneinander entfernt, so wird ihr Auffinden durch die Gegenfärbung sehr erschwert, und manche schwachsäurefeste Bacillen werden überhaupt der Beobachtung entgehen, wie es Ziehl selbst übrigens konstatiert hat. — Von den 3 von Much empfohlenen Methoden wurde die Methode II benützt, weil bei Voruntersuchungen die übrigen 2 schlechtere Resultate ergaben. Das Färben während 24—48 Stunden bei 37° wurde unterlassen, weil bei dieser Prozedur sich stets sehr unangenehme Niederschläge bildeten, welche das Auffinden der Granula stark beeinträchtigten. Deshalb wurden die Ausstriche auch nach dieser Methode vorsichtig

unter Erwärmen, bis Dämpfe abgingen, 8—10 Minuten gefärbt. Nach dem Abspülen unter Wasserleitung wurde das Präparat 5 Minuten mit Lugol'scher Lösung behandelt, wieder mit Wasser abgespült und endlich mit den von Much angegebenen Reagenzien entfärbt. Da trotz des sorgfältigsten Verfahrens bei dieser Methode die Farbstoffniederschlägebildung nicht ganz zu vermeiden war, wurde der Farbstoff vor jedem Gebrauch filtriert. — Nach Herman wurden die Präparate 7—8 Minuten unter Erwärmen ohne Aufkochen gefärbt; unter dieser Zeit ist das Präparat nicht genügend mit dem Farbstoff imbibiert, was bei der Entfärbung leicht zu merken ist: dieselbe geht sehr rasch vor sich. Auch hier war die Gegenfärbung nicht nötig; dieselbe wird übrigens von Herman selbst nicht empfohlen. — Bei der Anwendung der Knoll-Methode mussten dank den Voruntersuchungen manche Abweichungen in Bezug auf die Färbung getroffen werden. Da das Färben während 24 Stunden keine besseren Resultate ergab, wurden die Präparate unter Erwärmen 7—10 Minuten gefärbt. Das «Blasenspringen» wurde vermieden, weil sonst die Farbstoffniederschläge unvermeidlich waren. Das übrige Verfahren war dasselbe, wie es Knoll angegeben hat. Die Farbstoffmischung wurde alle 3 Tage frisch bereitet und vor jeder Benützung filtriert.

Die Umfärbungen, welche an den Ausstrichen zum Vergleich zweier verschiedenen Methoden vorgenommen wurden, geschahen in der Weise, dass das nach Ziehl gefärbte Präparat ohne vorherige Entfärbung nach der modifizierten Gram-Methode tingiert wurde und umgekehrt. Dies bot keine Schwierigkeiten, da bei der Umfärbung von der ursprünglichen Tinktion nichts zu merken war.

Bei den bacillenfreien Sputumproben wurde das Anreicherungsverfahren angewandt. Es wurden dabei zwei Methoden benützt: die von Schmorl (96) angegebene, welche eine Vorbehandlung des Materials mit Antiformin vorausschickt, und die im Freiburger Hygienischen Institut übliche Methode, welche mit einem Gemisch von Antiformin und Ligroin arbeitet. Mit Hilfe der letzten sollen nach Mitteilung von Münch (80) in 20%

der bacillenfreien Sputa die Tuberkelbacillen nachweisbar sein. Bei der Anwendung der ersten Methode wurde derart verfahren, dass zu 20 ccm 15% Antiforminlösung 1 ccm Sputum zugesetzt und das Gemisch unter zeitweiligem kräftigem Durchschütteln ¾ Stunden stehen gelassen wurde. Danach wurde es zentrifugiert und die über dem Sedimente stehende Flüssigkeit vorsichtig abgegossen. Der Bodensatz wurde mittelst einer Kapillare entnommen und mit einer kleinen Menge desselben nicht mit Antiformin behandelten Sputums in dünner Schicht auf Objektträger ausgestrichen. — Das Verfahren bei der Anwendung der zweiten war folgendes: 5 ccm Sputum wurden mit 15 ccm frisch mit lauem Wasser bereiteter 20% Antiforminlösung versetzt und einigemale kräftig durchgeschüttelt, bis die Flüssigkeit eine homogene Beschaffenheit angenommen hatte. Alsdann wurde das Ganze ½ Stunde stehen gelassen, bis sich 3 deutliche Schichten gebildet hatten. Das Material wurde aus der mittleren Schicht, welche die bacillenhaltige sein soll, mittelst einer Platinöse auf Objektträger gebracht.

Die Schnitte wurden nach denselben Methoden gefärbt wie die Sputa. Vor der Färbung wurden die Schnittpräparate nach bekannter Weise mit Xylol und absteigendem Alkohol behandelt. Die Färbung geschah stets über einem Wasserbade bei allen 4 Methoden, und zwar aus folgenden Gründen: Färbt man das Schnittpräparat nach der von Schmorl (96) beschriebenen Methode, indem man das Karbolfuchsin ½ bis 1 Stunde bei 37° einwirken lässt, so wird oft, besonders wenn die Bacillen in Minderzahl vorhanden sind, das Resultat der Untersuchung negativ ausfallen, da die Färbung anscheinend nicht genügend ist; lässt man das Präparat, wie es Much empfiehlt, in MetylviolettBNlösung bei 37° während 24—48 Stunden liegen, so wird die Farbstoffniederschlägebildung dadurch stark begünstigt; will man endlich das Schnittpräparat nach Knoll unter Erwärmen über der Flamme färben, so wird die Gewebestruktur ziemlich beschädigt. Die Technik bei der Untersuchung von Schnitten war folgende: Das zur Färbung vorbereitete Präparat wurde mit der Farbstofflösung übergossen und auf ein

Wasserbad gebracht, woselbst es bis zur Dampfbildung blieb; nach 15 Minuten war die Färbung fertig, und nach dem Abspülen unter Wasserleitung wurde das Präparat entfärbt; nach der Entfärbung wurden die Schnitte, bevor sie in Canadabalsam eingebettet waren, mit Alkohol und Xylol in üblicher Weise wiederum behandelt. Auch für die nach der Herman-Methode gefärbten Schnittpräparate wurde dasselbe Verfahren beibehalten, weil, wenn man die Behandlung mit Alkohol und Xylol nach der Entfärbung des Präparates unterlässt, und man es bloss über einem Wasserbade, nach der Vorschrift von Herman, trocknen lässt, die mikroskopischen Bilder ihre Klarheit ziemlich einbüssen.

Zur Untersuchung von sämtlichen Präparaten wurde ein «Leitz»-Mikroskop verwendet. Die Präparate wurden mit Okular 2 und die Bacillen mit Okular 3 und $^1/_{12}$ Oelimmersion untersucht.

Im Folgenden komme ich nunmehr zur Besprechung der Befunde, die ich bei meinen vergleichenden Untersuchungen über die Leistungsfähigkeit der benützten Methoden erhoben habe. Ich wandte die Ziehl-Neelsen-Methode bei meinen Färbeversuchen immer an erster Stelle an, nicht etwa um ihre Leistungsfähigkeit nachzuprüfen, sondern um einen Massstab für die Brauchbarkeit der übrigen drei Methoden zu erhalten, und ich gewann tatsächlich die Ueberzeugung, dass diese Methode den zwei Forderungen, die an leistungsfähige Färbung gestellt werden, im genügenden Masse entspricht; sie arbeitet schnell und sicher. Mit der Methode bekommt man am meisten Tuberkelbacillen und am besten gefärbte; die Verwechslungsmöglichkeit mit anderen Keimen ist beinahe ausgeschlossen. In keinem der zur Untersuchung gelangten Fälle — ausgenommen die 5 bacillenfreien Sputa und einige Schnitte — bot mir das Auffinden der Bacillen mit dieser Methode irgendwelche Schwierigkeiten, wenn auch die Zahl derselben gering war. Bei zahlreichem Vorhandensein lagen die Bacillen in allen mög-

lichen Lagen zu einander, kleine Häufchen bildend. Manchmal lagen 2 oder 3 hintereinander, einen Faden vortäuschend; jedoch bei näherer Betrachtung konnte man schmale, helle Zwischenräume, durch welche sie voneinander getrennt waren, wahrnehmen. Die Bacillen sind von verschiedener Dicke und erscheinen meist leicht gekrümmt. Sie färben sich gewöhnlich gleichmässig; jedoch bekommt man sehr oft gekörnte Stäbchen zu Gesicht, welche 3—4 Granula in ihrem Innern aufweisen. In manchen Fällen war die Zwischensubstanz, welche die Körner voneinander getrennt hat, so reduziert, dass man an Segmentation des Bacillus denken musste. In einem Falle, den ich hier näher anführen möchte, waren in grosser Zahl fast ausschliesslich gekörnte Bacillen und einige freie Körner neben denselben liegend. Es handelte sich in diesem Falle um ein 18jähriges Mädchen, welches wegen schwerer Lungen- und Darmtuberkulose in der medizinischen Klinik seit 14 Tagen in Behandlung stand. Es bestanden bei stark reduzierten Kräften hohes Fieber (bis 39,9) und Neigung zur Kavernenbildung; Patientin sonderte reichlichen eitrigen Auswurf ab. Nach 3½ Monaten kam der Fall ad Exitum, und der Sektionsbefund lautete u. a.: Chronische Lungentuberkulose — cavernös-nodös-pneumonische Form. Die einige Tage vor dem Tode zum zweiten Mal vorgenommene Untersuchung des Sputums von derselben Beschaffenheit ergab dasselbe Bild; nur war die Zwischensubstanz der meisten Bacillen so blass tingiert, dass man den Eindruck hatte, Kokkenreihen vor sich zu haben. In den meisten Fällen waren die Körner nicht grösser als der Durchmesser des Stäbchens. Sie lagen gewöhnlich in der Mitte des Bacillenleibes; auch an einem der Pole, manchmal sogar an beiden, konnte man sie in seltenen Fällen treffen, hier war ihr Durchmesser grösser als der des Stäbchens, auch waren sie in solchen Fällen intensiver als der Leib gefärbt. In vielen nach Ziehl gefärbten Präparaten fand ich auch Bruchstücke der Tuberkelbacillen von verschiedener Grösse (Spengler'sche Splitter?). Im allgemeinen sind die Bilder, die man mit Färbung nach Ziehl zur Darstellung bringt — besonders bei Unterlassung der Gegenfärbung —

klar und von Niederschlägen vollkommen frei. Auf dem fast farblosen Grunde treten kräftig gefärbte Bacillen deutlich hervor und sichern durch typisches, unverkennbares Aussehen die Diagnose der Tuberkulose im vollsten Masse.

Die zweite Stelle gebührt meines Erachtens der Methode von Herman. Mit der Methode färben sich die Bacillen violett und heben sich von schwach gefärbtem Grunde sehr schön ab. Die Bacillen sind meist gekörnt und erscheinen weniger gekrümmt als die Ziehl'schen Stäbchen. Darin liegt der Unterschied der Methode von der Ziehl'schen. Irgend welche Vorteile der letzten gegenüber konnte ich — wenigstens auf Grund meiner Untersuchungen an den Sputis — nicht wahrnehmen: die Methode bringt nicht mehr Bacillen zur Darstellung als die Ziehl'sche und versagt ebenso dort, wo die Ziehl'sche Methode es tut. Die verhältnismässig milde Entfärbung, welche bei dieser Methode zur Anwendung kommt, erweckt sogar Bedenken über das spezifische Merkmal der Tuberkelbacillen — ihre Säurefestigkeit, so dass man annehmen könnte, dass nicht alle violetten Stäbchen Tuberkelbacillen darstellen, jedoch schliessen auch hier das für Tuberkelbacillen specifische Aussehen der Stäbchen, sowie ihr alleiniges Vorkommen in Präparaten die Verwechslungsmöglichkeit mit anderen Bakterien beinahe aus. — Anders verhält es sich mit Schnitten, für welche diese Methode ursprünglich bestimmt war. In einer Serie von Schnitten aus der Lymphdrüse eines an experimenteller Tuberkulose zugrunde gegangenen Meerschweinchens konnte ich mit dieser Methode mühelos — wenn auch sehr wenig — kräftig gefärbte Tuberkelbacillen nachweisen; dagegen brachte in diesem Falle die Ziehl-Methode nach langem Suchen 2—3 kaum erkennbare blasse splitterförmige Bacillen zu Gesicht. Als Ersatz für die Ziehl'sche bei der Färbung der Schnitte kann ich die Herman-Methode nicht empfehlen, da meine Erfahrung auf diesem Gebiete in Anbetracht der ungenügenden Zahl von solchen Fällen nicht ausreichend ist; jedoch als Hilfsmittel kann sie sehr brauchbare Dienste erweisen. Bei der Untersuchung des menschlichen Materials ist sie der Ziel-Methode jedenfalls

ebenbürtig. Allerdings ist das Verfahren bei dieser Methode etwas umständlicher als dasselbe bei Ziehl; bei einiger Uebung geht aber auch dieses rasch vor sich. Der Farbstoff und die Präparate sind gut haltbar.

Die modifizierte Gram-Methode ist am wenigsten geeignet, schnelle und sichere Diagnose «Tuberkulose» zu stellen. Von den 3 von Much empfohlenen Modifikationen benutzte ich, wie oben erwähnt wurde, nur die zweite. Das Verfahren bei Färbung mit dieser Methode ist sehr umständlich. Besonders schwer fällt die Differenzierung des Präparates. Mir gelang die Differenzierung niemals beim ersten Male: entweder war das Präparat zu wenig differenziert, wodurch der Anlass zur Verwechslung mit anderen grampositiven Keimen gegeben wurde, oder die Granula entfärbten sich. Die Differenzierung geschah deshalb unter ständiger Kontrolle des Mikroskopes. Gelingt die Differenzierung, dann sieht man in den mit dieser Methode gefärbten Sputumpräparaten gramfeste, gleichmässig gefärbte Stäbchen, die stets in Minderzahl vertreten sind. Viel häufiger begegnet man in solchen Präparaten den ungleichmässig gefärbten Stäbchen, welche zwischen violett- bis schwarztingierten Partien helle Lücken aufweisen, dann aneinander gereihten Körnchen vom Aussehen von Streptokokken, die bei näherer Betrachtung die zwischenliegende, sehr blass tingierte Substanz — meist nur die Reste derselben — erkennen lassen, und schliesslich den frei liegenden Einzelkörnern, die in unregelmässigen Häufchen über dem ganzen Präparat verstreut sind. Die letzten sind bedeutend kleiner als die Granula, die den Stäbchenverband noch erkennen lassen. Jene wie diese zeigen regelmässige Konture, sind kugelrund und im ungefärbten oder schwach gefärbten Zustande bei gewisser Einstellung des Mikroskopes lichtbrechend. Die grösseren im Bakterienleib gelegenen Körnchen, deren Zahl gewöhnlich zwischen 3 und 5 schwankt, sind meist mittelständig; seltener trifft man sie an die Wand gerückt. — Die Körnerreihen mit blasstingierter Zwischensubstanz, ja sogar nur mit Andeutungen derselben, haben das typische Aussehen des Koch'schen Bacillus,

so dass ihre Erkennung keine Schwierigkeiten bietet; anders verhält es sich aber mit den Einzelkörnern. In keinem der Fälle, in welchen ich diesen Gebilden begegnet war, konnte ich mit Sicherheit feststellen, dass es sich tatsächlich um die granuläre Form handelt. Es ist ja auch leicht begreiflich: trotz der Uebung und Sorgfalt gelingt es nicht, die Verwechslung mit den Farbstoffniederschlägen zu vermeiden, wenn auch M u c h anderer Meinung darüber ist. Färbt man das Präparat bei 37° während 24—48 Stunden, wie es der Autor will, oder unter Erwärmen schnell, den Farbstoffniederschlägen kann man nicht entgehen. Im letzten Falle ist ihre Bildung sogar bedeutend geringer, was ich bei meinen Untersuchungen mit Sicherheit festgestellt habe. Beim vorsichtigen Erwärmen — ohne den Farbstoff zum Aufkochen zu bringen — ist das Aufwallen der Farbstofflösung fast ausgeschlossen. Dagegen sieht man am Präparate, das bis 48 Stunden in der Farbstofflösung lag, schon makroskopisch Klümpchen von Farbstoff. Es ist selbstverständlich, dass diese mehr Zeit brauchen, um sich zu lösen, als es für die Entfärbung des Präparates nötig ist. Da zumal die Granula in Form von kleinen Pünktchen im Präparate erscheinen, so ist ihre Unterscheidung von den Farbstoffniederschlägen absolut unmöglich. Ebenso gelingt es in keiner Weise, die Granula vom Kohlepigment und Detritus zu unterscheiden, zumal diese sehr oft regelmässige Konture aufweisen und nicht grösser sind als die Granula. — Was nun die Körnchenreihen, bei denen die Zwischensubstanz ganz verloren gegangen ist, betrifft, so sind auch diese meiner Erfahrung nach von zweifelhaftem diagnostischen Werte. Man trifft sie sehr oft in den mit der modifizierten G r a m - Methode gefärbten Präparaten zugleich mit Körnerreihen, die noch Reste der Zwischensubstanz besitzen; in solchen Fällen braucht man selbstverständlich auf sie nicht besonders zu achten. Trifft man aber in solchen Präparaten nur die ersteren, so fällt ihre Erkennung sehr schwer, weil sie volkommen den Streptokokkenketten gleichen. Es wird allgemein angenommen, dass die Granula kleiner als Kokken sind; ich muss aber gestehen, dass ich in den Streptokokkenrein-

kulturen, die ich nach Gram färbte, Ketten fand, welche in keiner Weise sich von diesen Körnerreihen unterschieden: die Grösse der Kokken variiert ebenso, wie die der Granula, welche die Körnerreihen bilden. Nur die einzelliegenden Granula, die oft nur als Pünktchen angedeutet sind, stehen den Kokken in der Grösse nach. Um diese Schwierigkeiten bei der Untersuchung des Materials aus dem Wege zu schaffen, suchte ich diese Körnchenreihen, sowie die Einzelkörner in den Tuberkelbacillenreinkulturen zu erkennen. Ich färbte deshalb Reinkulturen vom Typus humanus, sowie Typus bovinus mit derselben Methode. Beide Typen verhalten sich der Färbung gegenüber ganz gleich. Die jungen Kulturen sind für solches Studium am wenigsten geeignet, da die in ihnen vorkommenden Gebilde fast ausschliesslich gleichmässig gefärbte Stäbchen darstellen, welche in den Sputumpräparaten nur ausnahmsweise zu treffen sind. In älteren Kulturen sieht man beinahe nur granulierte Stäbchen, deren Zwischensubstanz blass tingiert erscheint, und schliesslich in zweimonatealten Kulturen trifft man nur Granula, die fast keine Spur von Zwischensubstanz zeigen. Sie sind meist in Reihen angeordnet. Diese Körnerreihen bilden Gruppen, zu welchen sich gewöhnlich die Tuberkelbacillen in den nach Ziehl gefärbten Präparaten ordnen. Diese Häufchen sind für Tuberkelbacillen so charakteristisch, dass man auch solche Körnchenreihen ohne Schwierigkeiten als Tuberkulosevirus diagnostizieren kann. Auch frei liegende Körnchenreihen und Einzelkörner trifft man in solchen Präparaten; sie sind aber stets in der Minderzahl und stellen keine typischen Gebilde dar; ihr diagnostischer Wert ist somit sehr gering. Um so schwieriger fällt nun die Erkennung dieser Gebilde in den mit der modifizierten Gram-Methode gefärbten Sputumpräparaten, zumal man hier mit einem Gemisch von allerlei grampositiven Keimen zu tun hat.

Im Nachstehenden zitiere ich 5 Fälle, bei denen ich mit Hilfe der modifizierten Gram-Methode das Tuberkulosevirus nachzuweisen suchte. In allen 5 Fällen bestand nur Verdacht auf Tuberkulose und zwar in Anbetracht des klinischen Be-

fundes, wenn auch die Untersuchung der Sputa auf Tuberkelbacillen wiederholt negatives Resultat ergab. Ich färbte die Ausstriche der betreffenden Sputa mit Ziehl-, Herman- und modifizierten Gram-Methoden. Zuerst wurden die Sputa frisch untersucht, dann wurden sie mit Antiformin, bezw. Antiformin-Ligroin behandelt und von neuem untersucht.

Fall 1. Z., 35½jährige Fabrikarbeiterin.

Patientin ist zum zweiten Male im Spital; im vorigen Jahre war sie hier in Behandlung wegen Lungentuberkulose und wurde nach 3 Monaten in unverändertem Zustande entlassen.

Anamnese: (In der früheren Anamnese 5 starke Hämoptoën). In der Zwischenzeit fühlte sich Pat. erträglich. Jetzige Erkrankung begann vor 3 Wochen mit Schmerzen im Rücken, Husten und Atemnot. Pat. fühlte sich schwach, klagte über gestörten Schlaf und fehlen des Appetits. In der letzten Zeit nahm die Atemnot zu; es stellten sich Nachtschweisse und leichtes Fieber ein.

Spitalaufenthalt seit 13. November 1912.

Links oben das Atemgeräusch verschärft vesikulär mit verlängertem Exspirium. Links über der Clavicula, sowie vorne rechts vereinzelte nicht klingende Rasselgeräusche. Temperatur wenig erhöht. Sputum schleimig-eitrig mit geringen Blutbeimengungen.

Fall 2. N., 47½jähriger Steinhauer.

Anamnese: Seit 5 Jahren besteht andauernder starker Husten mit viel Auswurf. Letzte Zeit quält der Husten den Pat. hauptsächlich Nachts und Morgens. Pat. ist arbeitsunfähig.

Spitalaufenthalt seit 18 Februar.

Beim Eintritt lässt sich beiderseits leises Atemgeräusch mit lautem Giemen und mehr oder weniger reichlichen Rasselgeräuschen wahrnehmen. An der rechten Spitze verschärftes Exspirium, daselbst fein- bis mittelblasige, zum Teil klingende Rasselgeräusche. Temperatur subfebril. Dyspnoë mit Cyanose. Sputum reichlich, eitrig, putrid.

Fall 3. K., 17jähriger Ausläufer.

Anamnese: Seit 14 Tagen verspürt der Pat. Stechen in der linken Seite. Es besteht Husten, welcher von zähem Auswurf begleitet wird. Pat. fühlt sich unwohl. Leichtes Fieber, keine Nachtschweisse. Sputum schleimig.

Spitaleintritt am 11. Februar.

Ueberall Vesikuläratmen mit ganz vereinzelten feuchten, nicht klingenden Rasselgeräuschen. Auf 0,5 mg Tuberkulin ziemlich lange dauerndes Fieber.

Fall 4. A., 54jährige Hausfrau.

Anamnese: Seit 2 Jahren besteht andauernder, bald stärkerer, bald schwächerer Husten. Vom Februar 1913 musste Patientin Blut spucken. Sie klagt über Herzklopfen, Nachtschweisse und Diarrhöe.

Spitalaufenthalt seit 24. Juni.

Das Atemgeräusch überall vesikulär, an den Spitzen stark verschärft; daselbst spärliche, zum Teil klingende Rasselgeräusche. Hinten unten spärliche Rasselgeräusche. Temperatur subfebril. Sputum schleimig, hie und da mit Blut tingiert.

Fall 5. B., 70jährige Dienstmagd.

Anamnese: Pat. hustet seit 6 Jahren; der Husten wird von reichlichem schleimig-eitrigem Auswurf begleitet. Vor 8 Tagen bekam Pat. Stechen auf der ganzen Brust; seither wird der Husten stärker, der Auswurf reichlicher. Keine Nachtschweisse.

Spitaleintritt am 7. Juni.

Das Atemgeräusch überall etwas scharf vesikulär mit Giemen und mässig zahlreichen feinblasigen, zum Teil klingenden Rasselgeräuschen. Die letzten am reichlichsten beiderseits hinten oben. Temperatur bis 38,8. Sputum schleimig-eitrig geballt.

Es würde mich zu weit führen, wenn ich die Resultate meiner zahlreichen Untersuchungen an den Sputis der betreffenden Patienten hier ausführlich besprechen möchte. Ich gestatte mir deshalb dieselben zusammenstellend wiederzugeben, um so mehr als die Ergebnisse in allen Fällen dieselben waren. Weder mit der Ziehl-, noch mit der Herman-Methode konnte ich den Verdacht auf Tuberkulose bei den betreffenden Patienten rechtfertigen. Auch mit Hilfe des Anreicherungsverfahrens gelang es mir nicht. Was die Gram-Methode betrifft, so brachte sie in allen Fällen — ganz gleich, ob die Sputa frisch untersucht wurden oder nach vorheriger Behandlung mit Antiformin — Gebilde zur Darstellung, die ich nicht als Tuberkulosevirus ansprechen konnte: nicht im geringsten glichen sie den Tuberkelbacillen, wie wir gewöhnt sind, sie in den nach

Ziehl gefärbten Präparaten zu sehen. Es waren Einzelkörner von verschiedener Grösse, im einen Falle mehr, im anderen weniger, die entweder frei lagen oder zu zwei bis fünf in Reihen angeordnet waren. Sie zeigten keine Spur von Zwischensubstanz, so dass ich eher geneigt war, sie für Diplo- und Streptokokken zu halten, als für eine Abart des Tuberkulosevirus. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass ich im Falle 2 nicht ganz objektiv urteilen konnte, da, während ich mich mit den Untersuchungen des Sputums des betreffenden Patienten beschäftigte, eine Mitteilung von einer «Fürsorgestelle für tuberkulöse Kranke» kam, dass im Jahre 1912 im Sputum des Patienten, welcher damals dort in Behandlung stand, *Tuberkelbacillen* gefunden wurden. Ich liess mich selbstverständlich von dieser Mitteilung unwillkürlich beeinflussen; dennoch konnte ich im Sputum des Patienten nichts, was entferntest an ein Stäbchen erinnern würde, finden.

So mussten alle 5 Fälle — jetzt wie früher — nur als verdächtig auf Tuberkulose betrachtet bleiben, um so mehr als die Parralleluntersuchungen an den Sputis der an Bronchitis leidenden Patienten dieselben Resultate ergaben. Dass meine Annahme, es handle sich bei diesen Körnchenreihen und Einzelkörnchen nicht um Tuberkulosevirus, nicht ganz unbegründet war, bewiesen bald die Tatsachen. Die Fälle 1 und 2 kamen ad Exitum — der erste am 1. September 1913, der zweite am 9. März desselben Jahres. Beide wurden im hiesigen pathologischen Institute seziert, und bei beiden fand sich *keine Spur* von tuberkulösen Veränderungen, weder in der Lunge noch sonst irgendwo. Ich führe hier die Lungenbefunde an, welche bei der Autopsie erhoben wurden:

Ad Fall 1. Pathologisch-anatomische Diagnose: Braune Induration beider Lungen. Lobuläre Pneumonie des rechten Unterlappens. Ebenda Infarkt. Bronchiektatische Kaverne des rechten Oberlappens.

Ad Fall 2. Pathologisch-anatomische Diagnose: Steinhauerlunge. Chronisches substanzielles Lungenemphysem, Bronchiektasien, Bronchitis purulenta.

Aus diesen Sektionsbefunden geht mit Klarheit hervor, dass ich mich auf dem richtigen Wege befand, indem ich die Gebilde, welchen ich oft in den Sputapräparaten dieser Patienten begegnet war, nicht als Tuberkulosevirus anzusprechen wagte. Vielleicht gehören hierher — nebenbei bemerkt — die meisten Fälle von Neuman und Matson (83), die sie als «Phtisis fibrosa» bezeichnen, und welche «häufig unter dem Bilde einer Bronchitis mit Asthma und Emphysem, eventuell mit Bronchiektasien» verlaufen. Das Schicksal der übrigen 3 Fälle ist mir nicht bekannt. Die Fälle 3 und 5 wurden nach 3 Monaten, der Fall 4 nach 2 Monaten gebessert entlassen. So viel über den diagnostischen Wert der Einzelkörner und Körnchenreihen, welche keine Spur von Zwischensubstanz zeigen. Durch meine Untersuchungen glaube ich, bewiesen zu haben, dass man solche nicht diagnostisch verwerten soll, wenn man schweren Irrtümern nicht anheimfallen will. — Somit bleiben nur gramfeste, gleichmässig gefärbte Stäbchen und Körnerreihen, die — wenn auch nur Reste der Zwischensubstanz zeigen. Die ersten trifft man, wie ich es schon bemerkt habe, sehr selten in den mit Gram-Methode gefärbten Sputumpräparaten, die zweiten kommen aber meiner Erfahrung nach nur dort vor, wo auch die Ziehl'schen Stäbchen zur Darstellung gebracht werden können. Deshalb scheint mir der nach der Much'schen Entdeckung von v. Behring (8) gemachte Vorschlag, sich in Zukunft nicht mehr mit dem Nachweis der Tuberkelbacillen nach Ziehl zu begnügen, sondern auch zu untersuchen, ob die granulären Zerfallprodukte des Tuberkulosevirus vorhanden sind, nicht von grossem praktischen Werte zu sein.

Es ist nicht zu leugnen, dass es Stäbchen gibt, die sich nur nach Gram darstellen lassen; andererseits steht aber für mich fest, dass die Mehrzahl der nach Gram färbbaren Stäbchen sich auch mit der Ziehl-Methode färbt. Zu diesen Schlüssen bin ich gekommen auf Grund der *Umfärbungen*, die ich an bereits gefärbten Präparaten vorgenommen habe. Bei diesen Umfärbungen verfuhr ich folgendermassen: die nach Gram gefärbten Präparate färbte ich nach Ziehl um und umgekehrt.

Die Resultate solcher Umfärbungen waren stets überraschend: die Körnerreihen in den mit Gram gefärbten Präparaten, sogar solche, die kaum die Zwischensubstanz erkennen liessen, erschienen bei der Umfärbung nach Ziehl als typische teilweise gleichmässig, teilweise ungleichmässig blassrot gefärbte Stäbchen, und umgekehrt wandelten sich die nach Ziehl meist homogen darstellbaren Stäbchen bei der Umfärbung nach Gram in Körnerreihen um. Jedoch musste ich mich bald überzeugen, dass nicht alle Körnerreihen sich nach Ziehl umfärben lassen. Dies wurde auf folgende Weise festgestellt: In dem nach Gram gefärbten Präparate zeichnete ich mir bis auf kleinste Details die Umgebung einer möglichst isolierten Körnchenreihe. Bei der mikroskopischen Untersuchung dieses nach Ziehl umgefärbten Präparates fand ich sehr oft an dieser Stelle ein rot gefärbtes Stäbchen; es gab aber Fälle, wo ich an der Stelle solcher Körnerreihe nichts finden konnte. Allerdings waren solche Fälle in der Minderzahl. Diese Tatsache, sowie jene, dass bei der Umfärbung des nach Ziehl gefärbten aus einer älteren Reinkultur angefertigten Präparates nach Gram, die Menge des Tuberkulosevirus grösser wird, gibt mir das Recht, zu glauben, dass es Stäbchen gibt, die sich nur nach Gram färben. — Mit Hilfe ebensolcher Umfärbungen suchte ich ferner die Beziehungen der «granulären» Form zu den säurefesten Stäbchen festzustellen. Auf Grund der Untersuchungen an den Sputis der tuberkulösen Kranken kam Rosenblat St. (93) zum Schlusse: «mit der Abnahme der säurefesten Stäbchen» steigt «die Anzahl der granulären Form und umgekehrt.» Es war nun interessant, diesen Befund einer Nachprüfung zu unterziehen. Ich untersuchte die Sputa wiederholt und suchte es in einem solchen Momente auszuführen, wo irgend eine Aenderung im Zustande des Patienten eintrat. Meine Ergebnisse waren geradezu entgegengesetzte. Als Beweis dafür führe ich hier einige charakteristische Fälle an. Die Daten links bezeichnen die Tage, an welchen die Sputa untersucht wurden.

Fall 1. S., 21jähriger Buchbinder. Leichte Affektion der rechten Spitze mit spärlich schleimigem Auswurf. Pleuritis tuberculosa. Peritonitis tuberculosa. Tuberkulinprobe zuerst

vertragen; später mittelstarke Reaktion. Kräftezustand gering. Temperatur nicht über 37,7°. Im Sputum keine T. B. Spitaleintritt am 27. August 1912.

18. Januar. Allgemeinbefinden ordentlich. Hie und da leichte Temperaturanstiege.

Ziehl: vereinzelte T. B. Umf. nach Gram: O.

30. März. Lungenstatus idem. Temperatur andauernd unter 37°. Kräftezunahme.

Ziehl: O. Umf. nach Gram: O.

Am 8. April gebessert entlassen.

Fall 2. K., 27jähriges Dienstmädchen. Schwere Erkrankung der ganzen rechten Lunge und mittelmässige Affektion des linken Oberlappens. Temperatur bis 39,7°. Kräfte stark reduziert. Starke Diazoreaction. Sputum reichlich eitrig geballt. Spitaleintritt am 4. März.

6. März. Status idem.

Ziehl: massenhaft T. B. Umf. nach Gram: viele Körnerreihen von 3—5 Körnern.

17. März. Rascher Kräfteverfall. Plötzlicher Temperaturanstieg von 37,3° auf 39,3°. Sputum sehr reichlich von derselben Beschaffenheit.

Ziehl: wie oben. Umf. nach Gram: wie oben.

Am 22. März plötzlicher Exitus.

Fall 3. Z., 53jährige Näherin. Mässig intensive Erkrankung der ganzen rechten Seite und leichte Affection der linken. Auswurf spärlich, hauptsächlich schleimig ohne T. B. Temperatur subfebril. Keine Nachtschweisse. Pirquet positiv. Allgemeinbefinden ziemlich gut. Spitalaufenthalt seit 29. Januar.

5. Februar. Status idem.

Ziehl: O. Umf. nach Gram: O.

3. April. Husten geringer. Auswurf spärlicher, besteht fast nur aus Schleim.

Ziehl: O. Umf. nach Gram: O.

14. April. Temperatur 39°. Allgemeinbefinden noch immer ordentlich.

Ziehl: vereinzelte T. B. Umf. nach Gram: O.

Am 10. Mai gebessert entlassen.

Fall 4. T., 22jähriger Schlosser. Infiltration des rechten Oberlappens und mässig intensive Erkrankung des linken Ober-

und Mittellappens. Subfebrile Temperatur. Allgemeinbefinden ordentlich. Wenig Sputum. Dasselbe schleimig mit eitrigen Streifen. Mässig viele T. B. Spitaleintritt am 26. Februar.

27. Februar. Ziel: spärliche T. B. Umf. nach Gram: 2—3 Körnchenreihen und Einzelgranula (Kokken?).

9. Mai. Temperatur 38,3°. Sonst status idem.

Ziel: mässig viele T. B. Umf. nach Gram: wie oben. Entlassen nach Davos am 15. Mai.

Vergleichen wir nun die mikroskopischen Befunde, die bei diesen 4 Fällen erhoben wurden, so fällt uns sofort auf, dass die säurefesten Stäbchen und die «granuläre» Form zueinander in direkter Proportion stehen: nimmt die Zahl der säurefesten ab, so verschwindet die «granuläre» Form fast; wird die Zahl der säurefesten grösser, dann steigt auch die Menge der «granulären» Form. Wir sehen ausserdem, dass man von einer Proportion dieser zwei Grössen überhaupt nur dann sprechen kann, wenn die Anzahl der säurefesten Stäbchen erheblich gross ist, und nur ausnahmsweise trifft man die «granuläre» Form in Präparaten, in welchen die Färbung nach Ziehl nur spärliche Bacillen zum Vorschein bringt. Somit, glaube ich, begehen wir keinen Fehler, wenn wir annehmen, dass die «granuläre» Form fast ausschliesslich bei mehr oder weniger schweren Formen der Lungentuberkulose anzutreffen ist. Von diesem Standpunkte ausgehend, kann man ihr einen gewissen prognostischen Wert nicht absprechen; nun sind aber bei solchen Fällen der klinische Befund und das Allgemeinbefinden der betreffenden Patienten so eindeutig, dass man kaum in die Lage versetzt wird, die Sputa mit der ziemlich umständlichen modifizierten Gram-Methode zu untersuchen.

Zweifellos ist diese Methode für die Untersuchung von *Schnitten*, für welche sie von Much auch ursprünglich bestimmt war, bedeutend mehr geeignet. Die Verwechslung der Granula mit anderen grampositiven Keimen ist beinahe ausgeschlossen. Auch die Farbstoffniederschläge stören beim Mikroskopieren viel weniger, vorausgesetzt dass die Schnitte über dem Wasserbade gefärbt werden. Wird bei 37° gefärbt, so beeinträchtigen die Farbstoffniederschläge das Mikroskopieren eben-

soviel, wie es bei den Sputumpräparaten der Fall ist. Jedoch auch hier hat diese Methode einen Nachteil: die Granula stechen schlecht vom Schnittgewebe ab, wodurch ihr Auffinden ziemlich erschwert wird. Was nun die Leistungsfähigkeit dieser Methode bei der Untersuchung von Schnittpräparaten, in welchen Ziehl kein Virus zur Darstellung bringt, betrifft, so muss ich mir wegen ungenügender Zahl solcher Fälle irgendwelche Schlüsse über diesen Punkt zu ziehen, versagen. Mir stand nur ein solcher Fall zur Verfügung, und dennoch gelang es mir auch in diesem Falle, säurefeste, wenn auch stark beschädigte Stäbchen nachzuweisen. Ueber diesen Fall habe ich bereits oben berichtet. Es waren Schnitte aus der Lymphdrüse eines Meerschweinchens, bei welchen die Herman-Methode die besten Resultate ergab. Merkwürdigerweise brachte die modifizierte Gram-Methode in diesem Falle überhaupt keine Keime zur Darstellung: ich sehe ab von den weit voneinander entfernten Einzelkörnern, die meiner Ueberzeugung nach nur Niederschläge sein konnten. — Ebenso versagte diese Methode vollständig bei der Untersuchung der 3 Hodgkin-Fälle, die ich Gelegenheit hatte zu untersuchen. Much (79) glaubt nämlich, dass der *Morbus Hodgkin* durch einen Erreger hervorgerufen wird, der dem Tuberkelbacillus nahe verwandt ist, da Much in den Schnitten aus Organen der Menschen, die an dieser Krankheit zugrunde gegangen sind, dieselben Granula nachweisen konnte. Inwiefern Much recht hat, kann ich nicht entscheiden; jedenfalls enthielt eine ganze Reihe von Schnitten aus den Organen dieser 3 Fälle überhaupt keine Keime. Vielleicht gibt gewisse Aufschlüsse über diese Meinung von Much folgende Mitteilung von Löffelmann (67): Autor untersuchte 7 Hodgkin-Fälle aus der Sammlung des pathologischen Institutes in Strassburg und fand mittelst Antiformin in 6 von diesen Ziehl'sche Stäbchen zugleich mit grampositiven Stäbchen und Granulis. Ob Löffelmann es dem Antiformin zu verdanken hat, weiss ich nicht. Mir gelang jedenfalls die Anreicherung in keinem der Fälle, bei welchen die Ziehl-Methode versagte; bei spärlichem Bacillengehalt konnte ich

auch ohne Antiformin Bacillen nachweisen. Ich glaube, die Zahl der echten Hodgkin-Fälle wäre einigermassen verringert, wenn man die Färbung nach Ziehl, eventuell nach Herman, richtig und sorgfältig ausführen würde.

Zum Schluss will ich noch in einigen Worten die Resultate, die ich mit der Färbung nach Knoll erzielt habe, wiedergeben. Für die Untersuchung des klinischen Materials ist diese Methode vollständig überflüssig. Ihre Aufgabe besteht nämlich darin, die säurefesten Formen zugleich mit den grampositiven in einem Bilde zur Darstellung zu bringen. Will man nun schnell die Diagnose «Tuberkulose» stellen, so wird man ohne Zweifel die Färbung nach Ziehl ihr vorziehen, da das Verfahren bei der Ziehl-Methode spielend leicht, dagegen bei der Knoll-Methode sehr schwierig ist. Als Nachteile dieser Methode konstatiere ich in erster Linie die schlechte Haltbarkeit der Farbenmischung und die schwierige Differenzierung der Präparate. Die nach dem Rezept von Knoll vorbereitete Farbenmischung hält sich höchstens 3 Tage; auch die vom Autor gewünschte Proportion der Farbstoffe ist nicht immer zu treffen, so dass man angewiesen ist, die Farbenmischung gebrauchsfertig aus Grübler's Laboratorium zu beziehen. Die Differenzierung des Präparats ist insofern schwer, als man dieselbe stets unter dem Mikroskope kontrollieren muss, wenn auch Knoll (56) glaubt, dass man dieselbe «zeitlich durchaus nicht minutiös zu handhaben» braucht. Ich gebe zu, dass man dieselbe kaum so weit treiben kann, dass man entweder das Ziehlbild oder das Grambild vor sich hat; dass man aber bei ungenügender oder zu weit getriebener Differenzierung mit denselben Unannehmlichkeiten rechnen muss, denen man bei der Färbung mit modifizierter Gram-Methode begegnet, stellte ich auf Grund meiner Untersuchungen fest. Diese 2 Umstände machen die Knoll-Methode für die Untersuchung des klinischen Materials ziemlich unbrauchbar. Dagegen eignet sich diese Methode für das Studium der strukturellen Verhältnisse des Tuberkelbacillus sehr gut. In den mit dieser Methode gefärbten Präparaten traf ich vorwiegend rote Stäbchen mit

Granulationen, deren Zahl zwischen 3 und 5 schwankte. Die Granula waren blau bis tiefschwarz, oder teils rot, teils blau bis tiefschwarz und meist mittelständig; ihre Entfernung voneinander wies keine Regelmässigkeit auf. Oft konnte man auch sehr feinen blau tingierten gebogenen Stäbchen mit «ovoïden» Granulationen begegnen; ihr Durchmesser war stets grösser als der des Leibes und ihre Längsaxe der des Leibes parallel. Nur einmal sah ich ebensolches hellblaues Stäbchen mit runden blauen Körnern; dies glich vollständig einer Perlschnur. Fast regelmässig fand ich auch kurze dicke schwarze Stäbchen mit ebensolchen schwarzen Kügelchen an den Polen, die den Durchmesser des Stäbchens übertrafen. Und endlich sah ich etwas gebogene rotgefärbte Bruchstücke der Bacillen, welche an einem Ende zugespitzt waren und am anderen stets ein schwarzes oder dunkelrotes Granulum trugen. In sehr seltenen Fällen bekam ich noch einzelne Körner oder Häufchen derselben zu Gesicht. — Dies alles sind die Gebilde, die man in solchen Präparaten diagnostisch verwerten soll. Es ist meines Erachtens unmöglich, sie alle für Abarten des Tuberkulosevirus zu halten. Viele Stäbchen lassen sich ihrem typischen Aussehen nach als Tuberkelbacillen diagnostizieren, obwohl sie oft blaue zugleich mit roten Granulationen tragen. Hingegen haben die anderen wenig Aussehen von typischen Tuberkelbacillen: so erinnern die dicken geraden kurzen mit Granulationen an den Polen eher an Diphteriebacillen; sie sind in solchen Präparaten ziemlich konstant und sehr gramfest. Es ist höchst wahrscheinlich, dass auch andere Keime sich nach dieser Methode färben, und ich konnte mich tatsächlich überzeugen, dass, wenn ich die Entfärbung des Präparates etwas weiter getrieben habe, alle Formen mit Ausnahme der typischen Tuberkelbacillen verschwanden. Es ist möglich, dass dies gerade die jüngsten, wenig resistenten Formen des Tuberkelbacillus sind; dann drängt sich aber die Frage auf: warum trifft man sie nicht in den mit der modifizierten Gram-Methode gefärbten Präparaten? Im allgemeinen sind die Grambilder bei diesen verschiedenen Methoden nicht ganz gleich: eine blasstingierte

Zwischensubstanz, wie es bei Gram-Färbung allein der Fall ist, fand ich nicht in den mit Knoll-Methode gefärbten Präparaten, und feine gebogene Stäbchen mit «ovoïden» Granulationen traf ich nur einmal in den mit modifizierter Gram-Methode dargestellten Bildern. Ich brauche wohl kaum zu erwähnen, dass ich in keinem der auf Tuberkulose verdächtigen Fälle mit Hilfe dieser Methode den Verdacht rechtfertigen konnte.

Werfen wir nun einen retrospektiven Blick auf die Resultate, die mit diesen 4 Färbemethoden gewonnen wurden, so werden wir ohne weiteres zugeben müssen, dass die Ziehl-Methode doch den übrigen weit überlegen ist, wenn auch Lichtenhahn (64) glaubt, sie «dürfte nun als veraltet und unsicher unter Verdankung der geleisteten Dienste verschwinden».

Ueber das Wesen der „granulären" Form des Tuberkulosevirus.

Für die Frage nach der Natur der «granulären» Form des Tuberkulosevirus kommen nur die *Körnerreihen mit der blass tingierten Zwischensubstanz oder den Resten* derselben in Betracht. Die Möglichkeit ist nicht ausgeschlossen, dass das Tuberkulosevirus auch in Form von «unregelmässig, zu zwei oder einzeln liegenden» Granula vorkommen kann. Solange es aber kein spezifisches Färbeverfahren zu ihrer Darstellung gibt, ist man im Einzelfall nie sicher, ob es sich tatsächlich um Tuberkulosevirus handelt, und deshalb ist eine Beurteilung der Bedeutung dieser Form unmöglich. In Bezug auf die *Definition der «granulären» Form* stimme ich Much insofern bei, als auch ich die Granula *teils* als nach Ziehl nicht darstellbare Form des Tuberkulosevirus betrachte. Ich zweifle nur, dass die Granula eine *besondere Form* des Tuberkulosevirus darstellen und glaube vielmehr in völliger Uebereinstimmung mit Aronson (3), dass sie im engen Zusammenhange mit den in säurefesten Stäbchen nachweisbaren Granulis stehen. Es ist nicht ganz verständlich, wie Much zu diesem Schlusse kommt, denn auch er (79) will anerkennen, «dass die sogenannten Much'-

schen Granula sich . . . aus den in säurefesten Stäbchen nachweisbaren Granulis entwickeln.» Ihr verschiedenes Verhalten den Farbstoffen gegenüber, ihre angebliche verschiedene chemische Zusammensetzung berechtigen noch nicht zur Annahme, dass die nach Ziehl nicht darstellbaren Granula eine besondere Form des Tuberkulosevirus darstellen. Somit kann die Identität dieser Gebilde nicht in Abrede gestellt werden, und hier erhebt sich nun die Frage nach der *Bedeutung der Körnchenlung im Bacillenleib*, die seit der Entdeckung des Tuberkuloseerregers stets diskutiert wurde.

Schon Koch (57) hat darauf hingewiesen, dass der gefärbte Tuberkelbacillus nicht immer homogen erscheint, sondern oft einem dunklen Fädchen mit hellen eiförmigen Einschlüssen gleicht. Diese hellen Räume sprach Koch für «echte Sporen» an, da sie in ungefärbtem Zustande sich stark lichtbrechend erweisen. Dieser Meinung von Koch schlossen sich Baumgarten (7), Wesener (115), Voelsch (109) und Czaplewski (26) an, obwohl Baumgarten zugeben musste, dass die farblosen Stellen im Bacillenleib teilweise auch als Degenerationserscheinungen aufzufassen sind, da die Bacillen mit und ohne diese Gebilde gleiche Resistenz aufweisen. — Dieser Umstand, sowie die Unmöglichkeit, diese Gebilde sogar bei längerem Kochen zu färben, ihre bikonkave Form und ihr Vorkommen hauptsächlich in älteren Formen mit geringer Vegetationsfähigkeit sprachen selbstverständlich gegen den Sporencharakter dieser Lücken. Aus diesen Gründen sind Metschnikoff (73), Maffucci (68), Coppen Jones (22), Cornet und Meyer (24), Kitt (52) und Kolle und Ketsch (58) geneigt, sie eher für Vacuolen, Degenerationserscheinungen oder Anhäufungen von Reservestoffen als für Sporen zu halten. Uebrigens fasst Maffucci als Degenerations- oder Alterserscheinungen nur die farblosen Lücken im Bacillus der Säugetiertuberkulose auf; dieselben Lücken im Bacillus der Vogeltuberkulose sollen dagegen Sporen darstellen, da die Entwicklung der echten säurefesten Stäbchen aus solchen lückenhaltigen Bacillen der Vogeltuberkulose vom Autor experimentell nach-

gewiesen werden konnte. v. Betegh (11) ist dagegen überzeugt, dass die farblosen Stellen im Bacillenleib immer Sporen enthalten; zu ihrem Nachweis soll sich sehr gut die vom Autor angegebene b-Tolinmethode eignen. Ihr Auskeimungsvermögen betrachtet v. Betegh als sichergestellt, ebenso ihre Identität mit den Spengler'schen Splittern und den Much'schen Granulis. Kirchenstein (51), der ebenfalls zu der Spengler'schen Schule gehört, teilt die Ueberzeugung von v. Betegh vollständig.

Da die dunkeltingierten Körnchen, die zwischen den farblosen Lücken liegen, in vielfacher Beziehung mehr als die letzten an Dauerformen erinnerten, so wurden eben diese von v. Schroen (98), Nocard und Roux (86), Metschnikoff (73), Bongert (18) und Pane (87) für Sporen angesprochen. Allerdings will Bongert als solche nur polargelegene intensiv gefärbte Körnchen ansehen. Coppen Jones (22), der ebenfalls vom Sporencharakter der grösseren Körnchen überzeugt ist, nennt sie jedoch «sporenähnliche Gebilde», da die spezifischen Merkmale der Sporen ihnen fehlen; die kleineren, ebenfalls intensiv färbbaren und scharf kontourierten Körnchen sind seiner Meinung nach Vorstufen der ausgebildeten «Sporen». — D'Arrigo (5) spricht von «Keimkörnchen», die Keime des Koch'schen Bacillus darstellen sollen. Solche Körnchen können nach ihm im Gewebe der Drüsen im Latenzstadium vorkommen und bei abgeschwächter Widerstandsfähigkeit des Organismus zu den Stäbchen auswachsen und virulent werden. — Nach v. Niessen (84) sind es «Cocculi — sphärische Derivate und Abkömmlinge» der Bacillenkörper, die bei günstigen Lebensbedingungen sich zu den vollwertigen Stäbchen entwickeln können. Sie stellen «wandständige proliferierte abgeschnürte Knospen des Plasmas» dar, die im Bacillenleib nicht nachweisbar sind. Durch mechanische oder andere Insulte können sie sich vom Plasma ablösen und bis zum Eintritt der günstigen Lebensbedingungen selbständig als «mikrophitäre» Gebilde weiter existieren; sie werden säurefest, wodurch ihr Nachweis keine Schwierigkeiten mehr bietet. —

Spengler (101) hält dagegen die «Cocculi» von v. Niessen nicht für Knospen, sondern für Involutionsformen. Sie sind mit den vom Autor in Sputis von Phtisikern gefundenen «Splittern» der Tuberkelbacillen identisch und kommen sowohl als aneinandergereihte Körnchen im Bacillenleib als auch isoliert ausserhalb desselben vor. Die letzten können experimentell unter optimalen Lebensbedingungen in Stäbchen übergeführt werden, weswegen sie eher an Sporen, wenn sie auch nicht den Charakter derselben besitzen, als an Knospen erinnern. Später nannte Spengler (103) die «Splitter» «sporoïde Körper», steht aber noch jetzt auf dem Standpunkte, dass sie auf involutivem Wege entstehen und Gebilde mit herabgesetzter Lebens- und Entwicklungsfähigkeit und geringer Virulenz darstellen. Zu ihrem Nachweis soll, «wenn alle anderen Methoden versagen», die vom Autor (104) angegebene Pikrinmethode dienen. — Nach Levy (63) sind die Körnchen «Inhaltsreste», die beim Zerfall des Bacillus zurückbleiben; an echte Sporen erinnern sie insofern, als auch sie die Aufgabe haben, die Art zu erhalten, und ebenfalls keimfähig sind. — Aus denselben Gründen hält Knoll (54) die mit der Doppelfärbung darstellbaren schwarzen Körner für echte Sporen. — Nach Babes (6) bestehen die Körnchen aus chromatischer Substanz (der Autor nennt sie «Metachromatische Körperchen»), die bei der Sporenbildung und bei der Zellteilung eine grosse Rolle spielen soll. — Ernst (31) wagt nicht, die Körnchen als Sporen anzusprechen, da sie sich mit Hämatoxylin, das in anderen Bakterien nur von den Kernen aufgenommen wird, gut färben, und nennt sie deshalb «sporogene Körner». — Neisser (82) und Günther (43) wollen überhaupt nichts von Sporen beim Tuberkelbacillus wissen, solange der Beweis der Fruktifikation der in Frage kommenden Gebilde nicht erbracht ist.

Nakanishi (81) glaubt, ohne es jedoch zu behaupten, dass die Körnchen um den Kern verdichtete Protoplasmamassen darstellen; vielleicht entwickeln sich aus ihnen Sporen. Feinberg (32) ist dagegen der Ansicht, dass die Körnchen selbst im Leibprotaplasma zerstreute Kerngebilde darstellen.

Während nun Gram (41) und Unna (108) nur konstatieren, dass der Tuberkelbacillus, der sich nach Ziehl homogen färbt, nach Gram, bezw. nach der Doppelfärbungmethode von Unna gefärbt, als Kokkenreihe erscheint, glauben Biedert und Siegel (15), dass die Körnchenreihen eine Varietät des Tuberkelbacillus, der je nach dem Nährmaterial als Fäden, Lang- und Kurzstäbchen und Kokken resp. Reihen von letzteren auftreten kann, darstellen, und Amann (2) stellte sogar eine Theorie auf, nach welcher der Tuberkelbacillus aus Kokken besteht, die mit mehreren Hüllen umgeben sind. — Baumgarten (7) verwirft als unbegründet die Behauptung, dass der Tuberkelbacillus als Kokkenreihe auftreten kann; dies erklärt sich einerseits durch mangelhaftes Mikroskopieren, andererseits durch Zusammenballung des Protoplasmas unter Einwirkung von starker Hitze, Jod oder Mineralsäuren. — Maffucci (68) führt diese Erscheinung auf den Zerfall des Protoplasmas zurück, Grimme (42) auf die Quellung des Protoplasmas unter Einwirkung des Farbstoffes.

Piery und Mandone (89) glauben dagegen, dass die Körnchen chromatinhaltige Gebilde darstellen, aus welchen jeder Koch'sche Bacillus besteht. — Flügge (33) hält die Körnchen für unregelmässige Gebilde, die auf den Zerfall der chromatischen Substanz des Protoplasmas zurückzuführen sind. Entweder handelt es sich dabei um Kunstprodukte oder um Alterserscheinung. Ihre Regenerationsfähigkeit zu den echten Stäbchen schliesst Flügge nicht aus. — Schliesslich fasst Bongert (18) diese Erscheinung als Degeneration auf.

Aus dieser kurzen Zusammenstellung ersieht man, wie verschieden die Ansichten über die Bedeutung der Gliederung im Bacillenleib sind. Andererseits fällt es aber auf, dass in bezug auf die Frage, *ob der Tuberkelbacillus Sporen bildet*, bei den meisten Forschern Einigkeit besteht: der Bacillus soll zu den sporentragenden Bakterien gehören. Die Grundbedingung für eine solche Behauptung fehlt, da es keinem der Autoren gelungen ist, einen sicheren Beweis der Auskeimung der «Sporen» zu erbringen. Trotzdem ist man zu dieser Annahme berechtigt

— meint Levy (63) — wenn man nur bedenkt, wie langsam die Tuberkelbacillenzüchtung vor sich geht, wie schwer die Untersuchung im hängenden Tropfen ist: die Auskeimung kommt eben zustande, ohne dass man sie verfolgen kann; allerdings besitzen die Dauerformen des Tuberkelbacillus alias «Inhaltsreste» die Merkmale der klassischen Sporen nicht. «Wenn man bei den Tuberkelbacillen von Sporen sprechen will — fügt der Autor hinzu —, so muss man sich von vornherein von dem Gedanken frei machen, dass es sich um Dauerformen hier handle, die man mit den classischen Bacillensporen auf eine Stufe stellen kann.» Knoll (54) geht noch weiter, indem er vorschlägt, den üblichen Begriff der Spore überhaupt zu modifizieren. «Es sind — meint der Autor — alle diejenigen kugeligen und ovoïden Wuchsformen von Bakterien, die imstande sind, die Art unter ungünstigen natürlichen Bedingungen auch dann noch zu erhalten, wenn die vegetative Form dazu versagt, um beim Eintritt günstiger Existenzmöglichkeiten zu der vegetativen Form der Art auszukeimen.» Beide Forscher stehen auf dem Standpunkte, dass der Tuberkelbacillus sich durch Teilung vermehrt, aber unter Umständen Sporen bilden kann. Ich sehe ab von den Mikrophotogrammen von v. Betegh (Centralbl. f. Bakteriologie etc. Bd. 58, H. 1, Tafel II), die «die verschiedensten Entwicklungsstadien» des Tuberkelbacillus darstellen sollen: in keiner Weise demonstrieren sie das, was v. Betegh (14) von ihnen behauptet. Ebensowenig überzeugend wirken die Resultate, die man mit der Doppelfärbung gewonnen hat: man sieht zwar in den mit der Methode von Knoll gefärbten Präparaten neben den Stäbchen Einzelkörner liegen und in *seltenen* Fällen sogar «die schwarzen Körner» (auch die roten, wie ich gesehen habe) aus dem Stäbchenverband austreten, jedoch ein natürlicher Vorgang muss nicht unbedingt darin erblickt werden: die Körner können ja durch eingreifende Präparation aus dem Stäbchenverbande ausgepresst bezw. ausgeschwemmt werden. Diese Punkte beachtend, muss man eigentlich zur Ueberzeugung kommen, dass der Beweis des Auskeimungsvermögens der verschiedenartigen

Gebilde, die man als Sporen ansprach, nicht als erbracht gelten kann, diese Gebilde — seien es helle Lücken im Bacillenleib, seien es dunkle Körner, seien es «Splitter», seien es endlich «Inhaltsreste» — weisen absolut keine Merkmale der Sporen auf — dennoch soll der Tuberkelbacillus Sporen bilden. Um den Tatsachen gerecht zu werden, wird man wohl bis auf weiteres die Frage, ob der Tuberkelbacillus Sporen bildet, negativ beantworten müssen. Schliesslich wäre es denkbar, dass die «Sporen» des Tuberkelbacillus in vielfacher Beziehung sich von den «classischen» Sporen unterscheiden; logisch undenkbar erscheint aber, dass sich der Bacillus *unter anscheinend gleichen Bedingungen* abwechselnd durch Teilung und Sporenbildung vermehren kann. In völliger Uebereinstimmung mit Eisenberg (30) glaube ich, dass wenn man von Entwicklungsformen spricht, «man doch unwillkürlich an ein obligates Stadium als Lebenscyclus» denkt.

Eine andere Meinung, die allerdings nur wenige Anhänger hat, wie wir es oben sahen, ist die, dass die Körnchen *Kerngebilde* darstellen. Gegen diese Auffassung spricht hauptsächlich der Umstand, dass bei den Bakterien der Zellkern nicht mit Sicherheit nachgewiesen wurde. Will man aber trotzdem die Körnchen als Kerngebilde betrachten, so wäre es doch zu erwarten, dass diese in einer gewissen Beziehung zu der Zellteilung stehen würden. Bis jetzt ist es aber noch nicht gelungen, das nachzuweisen: man sieht weder die Teilung der Körnchen noch irgendwelche Veränderungen, die auf ihre Beteiligung bei der Teilung des Tuberkelbacillus deuten würden.

Noch weniger lassen sich die Körner als *Reservestoffe* auffassen. Diese färben sich, wie Grimme (42) gezeigt hat, nicht nach Gram, die Körnchen dagegen sehr gut.

Schliesslich haben wir auch keinen Grund, die Körnchen für *Kunstprodukte* zu halten: dagegen spricht ihr konstantes Vorkommen, ihre regelmässigen Konture und die typische Anordnung im Bacillenleib.

Selbstverständlich gehört die Frage nach der Bedeutung der Granula in das Gebiet der reinen Hypothese, da es keinem der

Forscher gelungen ist, irgendwelche sicheren Beweise für die Richtigkeit seiner Annahme zu erbringen. Demnach erscheint jene Hypothese am glaubwürdigsten, die den Tatsachen am meisten entspricht. Als solche betrachte ich die von Liebermeister aufgestellte, nach welcher die Körnchen *Bestandteile des Bacillus* sind. Die Erkenntnisse, die man mit Gram- und Doppelfärbungen gewonnen hat, liefern tatsächlich den besten Beweis für die Richtigkeit dieser Annahme: alle Tuberkelbacillen — ganz gleich, ob das zur Untersuchung gelangte Material frisch oder mehrere Tage, sogar Wochen alt ist — erscheinen nach diesen Methoden gefärbt mit wenigen Ausnahmen granuliert. Ueber die wahre Natur dieser Granula wissen wir ebensowenig, wie über die Rolle, die sie im Leben des Bacillus spielen; solange sie nicht isolierbar sind, werden wir sie wohl nur nach ihrem tinktoriellen Verhalten beurteilen müssen. Das letzte gibt allerdings gewisse Aufschlüsse über den ersten Punkt: so spricht die starke Farbstoffaffinität der Körnchen für ihren hohen Chromatingehalt. Piery und Mandone (89), die sich ebenfalls zu der Meinung bekennen, dass die Körnchen Bestandteile des Tuberkelbacillus sind, nannten sie « points chromatiques ». Nach diesen Autoren besteht jeder Koch'sche Bacillus aus solchen Körnchen, die deswegen nicht immer sichtbar sind, weil sie von einer Substanz von wechselnder Färbbarkeit umgeben sind: färbt sich diese ebenso intensiv, wie die Körnchen, so werden die letzten verdeckt, andernfalls treten sie deutlich hervor. Diese Erklärung trifft nun meines Erachtens nicht ganz zu, denn ich glaube, 1. dass nicht jeder Koch'sche Bacillus wohl ausgebildete Körnchen enthält und 2. dass die « chromaticité variable », wie die Autoren die schwankende Färbbarkeit der die Körnchen umgebenden Substanz nennen, keine zufällige Erscheinung ist, sondern dass sie in inniger Beziehung zu der Entwicklung des Bacillus steht. Was den ersten Punkt betrifft, so glaube ich den Beweis darin finden zu können, dass nicht alle Stäbchen nach Gram gefärbt, Körnchen in ihrem Innern aufweisen, trotzdem die Gram-Färbung eine Elektivmethode für die

Körnchen darstellt. Ich erwähne nur die ganz jungen Kulturen, in denen man sehr oft den gleichmässig gefärbten Stäbchen begegnet. Für den zweiten Punkt bleibe ich allerdings den direkten Beweis schuldig. Wenn somit meine Meinung über die Beziehungen der die Körnchen umgebenden Substanz zum Entwicklungsgang des Tuberkelbacillus reine Hypothese ist, so glaube ich doch, sie auf Grund meiner zahlreichen Beobachtungen des verschiedenen tinktoriellen Verhaltens des Bacillus aufstellen zu dürfen. Diese Beziehungen stelle ich mir etwa so vor:

In den Jugendformen sind die Körnchen selbst noch nicht vorhanden, wohl aber Anlagen derselben, die man oft als glänzende Pünktchen im ungefärbten Bacillus sieht. Das wenige Chromatin, das das Protoplasma enthält, ist in diesem diffus verbreitet, weswegen der Bacillus homogen erscheint.

Bei fortschreitendem Wachstum wird der Chromatingehalt des Protoplasmas reicher; zu gleicher Zeit beginnt das Chromatin sich um die Anlagen der Körnchen anzuhäufen, wodurch die letzten auch färbbar werden; jedoch verdeckt sie das chromatinreichere Protoplasma.

Noch später konzentriert sich das Chromatin mehr und mehr um die Körnchen herum, ihre Grösse nimmt zu, Neubildung des Chromatins im Leibprotoplasma kommt nicht mehr zustande, wodurch die an Chromatin reicheren Körnchen sich besser als ihre Zwischensubstanz färben. Dies ist das Stadium des reifen Koch'schen Bacillus.

Von hier ab beginnt nun die Desintegration des Bacillus, die etwa folgende Etappen umfasst:

Die Körnchen geben ihr Chromatin allmählich an die Zwischensubstanz ab, und so bleibt die Färbbarkeit der Zwischensubstanz und der Granula einstweilen erhalten. Die Körnchen treten noch immer deutlicher hervor, da ihr Chromatingehalt den der Zwischensubstanz noch immer übertrifft.

Schliesslich reicht der Vorrat der Körnchen nicht mehr aus, weswegen die Zwischensubstanz und die Granula sich schwach färben, bis die Zwischensubstanz ihrer grösseren

Fläche wegen die Färbbarkeit ganz verliert. Die Substanz selbst ist aber noch nicht verloren gegangen, wofür die noch immer typische Anordnung der Körnchen spricht.

Der Bacillus ist an der Grenze seiner Vitalität angelangt, und nun beginnt seine Auflösung, der zunächst die Zwischensubstanz zum Opfer fällt.

Die Körnchen werden dadurch voneinander getrennt, werden immer kleiner, färben sich wegen ihres sehr geringen Chromatingehaltes sehr schwer und fallen schliesslich — früher oder später — ebenfalls der Autolyse anheim.

Dies ist der Prozess der Entwicklung und der regressiven Metamorphose des Tuberkelbacillus, der selbstverständlich im engen Zusammenhange mit den Bedingungen steht, unter welchen der Bacillus sich befindet.

Ist das Medium ungünstig, so verläuft der Prozess rasch, unter Umständen so rasch, dass es zur Auflösung der Zwischensubstanz kommt, ehe noch die Körnchen ihr Chromatin an den Leib abgegeben haben. Deshalb sind die letzten noch immer gut färbbar, wenn auch voneinander getrennt. So sieht man in den nach Ziehl gefärbten Präparaten, die vom phtisischen Sputum oder älteren Tuberkelbacillenreinkulturen stammen, nicht selten solche isolierte Körnchen; ihre Färbbarkeit, sogar die Säurefestigkeit sind vollkommen erhalten geblieben. Die rasche Auflösung der Zwischensubstanz im infizierten Organismus geschieht selbstverständlich unter Einwirkung der lytischen Kräfte desselben; in der Reinkultur fehlen aber diese Kräfte, so dass man annehmen muss, dass der Prozess der raschen Auflösung der Zwischensubstanz hier durch Einwirkung der Stoffwechselprodukte der Bacillen bedingt wird.

Ist dagegen das Nährmaterial in genügender Menge vorhanden, und die lytischen Kräfte des Organismus herabgesetzt, so zieht sich der Prozess der Entwicklung und der regressiven Metamorphose in die Länge. Bei sehr günstigen Lebensbedingungen tritt er erst dann ein, wenn der Bacillus sich nicht mehr teilt. Deshalb finden wir so wenig gekörnte Bacillen in den sehr jungen Reinkulturen.

Treten nun plötzlich ungünstige Lebensbedingungen auf, so teilt sich der Bacillus weniger intensiv oder gar nicht mehr; es kommt nun zum Anlagern des Chromatins um die Anlagen der Körnchen. Dies geschieht im Interesse der Selbsterhaltung des Bacillus, da die Körnchen dadurch zu Chromatinträgern werden. Wahrscheinlich stellt das Chromatin eines der wichtigsten Strukturelemente des Protoplasmas dar. Auf diese Weise kann der Bacillus bis zu einem gewissen Grade die schlechten Zeiten überdauern.

Gelangt er nun wieder in ein günstiges Medium, oder wird dasselbe Medium günstiger, so erholt er sich bald von seiner Erschöpfung, ergänzt seinen Bedarf an Chromatin von aussen her, teilt sich wieder, und so entstehen neue Individuen, die den Prozess gewissermassen wiederholen. Dadurch erklärt sich meiner Meinung nach das intermittierende Schwinden der Tuberkelbacillen in Sputis der Kranken, die langsam verlaufende Infektion mit gekörnten Bacillen bei den Tieren, das Fehlen der Tuberkelbacillen in den Organen derselben und die allerdings ziemlich beschränkte Existenzmöglichkeit dieses *obligaten Parasiten* ausserhalb des Wirtskörpers.

Erholungsfähig ist selbstverständlich nur der gekörnte Bacillus, bei dem die Zwischensubstanz nur die Färbbarkeit verloren hat: diese kann nun wiedererlangt werden. Geht aber die Zwischensubstanz selbst verloren, was bei den zerstreuten Granulis der Fall ist, so kann sie sogar beim Eintritt der optimalen Lebensbedingungen nicht wieder aufgebaut werden: der Bacillus ist tot, und die freigewordenen Granula gehen nun der Autolyse entgegen, was sich sehr gut in den Reinkulturen beobachten lässt. So sieht man Körnchen von verschiedener Grösse bis zu kaum wahrnehmbaren Andeutungen derselben. Ein gutes Beispiel dafür glaube ich ebenfalls in folgendem Citat aus einer der Much'schen (79) Arbeiten über die granuläre Form des Tuberkulosevirus finden zu können:

« . . . Die tuberkulösen Tiere sind bekanntlich in gewissem Sinne gegen eine Zweitinfektion geschützt. Spritzt man nun stark tuberkulösen Tieren eine Emulsion von Tuberkelbacillen

in die Bauchhöhle, und nimmt man von Zeit zu Zeit Peritonealexsudat aus der Bauchhöhle ab, so kann man verfolgen, wie die anfangs säurefesten Bacillen ihre Säurefestigkeit verlieren. Es treten dann die gramfärbbaren Granula auf. Diese halten sich einige Zeit, bis auch sie verschwinden. — Ganz anders bei einem Tiere, das erst im Anfange der tuberkulösen Erkrankung steht, das also noch nicht so stark gegen eine Zweitinfektion immunisiert ist. Hier verschwinden ebenfalls die säurefesten Bazillen zum grössten Teile in den ersten Tagen nach der Einspritzung. Dann sind fast nur noch gramfärbbare Granula sichtbar. Nach einiger Zeit jedoch findet man wieder säurefeste Stäbchen, *die sich aus den Granulis entwickelt haben*)*, da offenbar die auflösenden Kräfte der Bauchhöhle erschöpft sind.»

Vergleichen wir nun die Resultate der Zweitinfektion bei den stark immunisierten Tieren mit denselben bei den nicht in diesem Masse immunisierten, so ergibt sich folgendes: Im ersten Falle verfügt der Organismus über starke lytische Kräfte, die es dazu bringen, dass die Bacillen zunächst ihre Säurefestigkeit, dann überhaupt die Färbbarkeit verlieren, bis sie sich schliesslich vollständig auflösen. Bei den Tieren der zweiten Kategorie sind aber diese Kräfte nicht in hohem Masse vorhanden, wodurch die Bacillen, die von diesen Kräften angegriffen werden, nur ihre Säurefestigkeit und die Färbbarkeit verlieren: es bleiben noch die Granula sichtbar und auch diese lassen sich nur mit der verschärften Gram-Färbung zur Darstellung bringen. Die auflösenden Kräfte des Organismus sind aber bald erschöpft: die Bacillen erholen sich allmählich, erlangen ihre Färbbarkeit und mit ihr die Säurefestigkeit und teilen sich weiter.

Much bedient sich allerdings dieses Beispieles für ganz andere Zwecke. Der Autor sieht darin eine Bestätigung seiner Axiome, «dass aus dem Granulum . . . unter anderen Lebensbedingungen stets wieder ein Stäbchen werden kann.» So erklärt sich Much, dass die Bacillen, die zunächst unter Einwirkung

*) *Kursiv vom Verfasser.*

der auflösenden Kräfte der Bauchhöhle ihre Säurefestigkeit verlieren und in Granula zerfallen, sich wieder aus diesen Granulis entwickeln, sobald die Abwehrkräfte der Bauchhöhle erschöpft werden. Es sind damit nicht nur die Körnerreihen, sondern auch die isolierten Granula gemeint, da Much in seinen Arbeiten oft betont, dass aus den «granulären» Formen des Tuberkulosevirus, die als Körnerreihe und isoliertes Granulum auftreten, «das meiste Interesse das isolierte Granulum» «beansprucht». Ich glaube aber, dass sowohl im ersten Falle, als auch im zweiten die isolierten Granula dasselbe Schicksal teilen müssen, d. h. spurlos verschwinden.

Ebenso steht es mit der Virulenz der Körnerreihen und der isolierten Granula. Während nun Much auf dem Standpunkte steht, dass bei den beiden die « Virulenz vollkommen erhalten» bleibt, glaube ich, dass sie bei den ersten noch vorhanden ist, wenn auch sehr abgeschwächt, bei den zweiten dagegen ganz erloschen ist. Ich verweise nur auf die sehr instruktiven Befunde von Maffucci (68), der zahlreiche Untersuchungen an den Tuberkelbacillenreinkulturen verschiedenen Alters ausgeführt hat. So fand der Autor, dass eine 1 Jahr alte, auf coaguliertem glyceriniertem Blutserum bei 37° ausgewachsene Kultur der Säugetiertuberkelbacillen, die nur sehr kleine farblose Bacillen mit gefärbten Granulis enthält, die Meerschweinchen an Marasmus und nicht an Tuberkulose eingehen lässt; wenn aber ausnahmsweise an Tuberkulose, so in chronischer Form, die nicht vor 4 Monaten zum Tode führt. Eine 2 Jahre alte Kultur desselben Stammes, in der *nur* noch sehr feine, keine Regelmässigkeit in der Anordnung zeigende Granula zu finden sind, erzeugt bei den Meerschweinchen ausschliesslich Marasmus.

Diese Befunde sprechen wohl nicht für die vollkommen erhaltene Virulenz der isolierten und unregelmässig angeordneten Granula. Maffucci glaubt, dass in solchen Fällen Marasmus durch die Giftstoffe, die das Protoplasma der Granula absondert, hervorgerufen wird. Dies ist meiner Meinung nach sehr wahrscheinlich; nun bedarf aber das Tier einer erheblichen

Menge dieser Giftstoffe, die nur in einer alten Reinkultur enthalten sein kann, um an Marasmus zugrunde zu gehen. — Es ist wahr, dass Maffucci seine Präparate nicht mit der modifizierten Gram-Methode färbte, jedoch sind es dieselben Körnchen gewesen, die Spengler später als «Splitter» und Much als «besondere granuläre Entwicklungsform des Tuberkulosevirus» bezeichnet haben. Alle drei Arten von Körnchen sind Abkömmlinge der gleichen Bacillen, und deshalb müssen sie die gleichen Eigenschaften besitzen. Der Unterschied kann nur ein gradueller sein: während die ersten zwei noch mit den üblichen Methoden darstellbar sind, lässt sich die dritte, die bereits abgestorben ist, nur noch mit der verschärften Färbung zur Darstellung bringen.

Es bleibt mir nunmehr noch übrig, eine Entscheidung der Frage zu versuchen, in welcher Beziehung die Säurefestigkeit des Bacillus zu seinen Entwicklungsphasen steht, inwiefern sich die Granulasubstanz von der Zwischensubstanz unterscheidet und schliesslich, weswegen sich die Granula mit Vorliebe nach Gram färben. Dies halte ich aber in Anbetracht der gegenwärtigen unsicheren Kenntnisse der chemischen Zusammensetzung des Bacillus für gewagt. Es ist nicht ausgeschlossen, dass nicht allein die fetthaltige Hülle an der Säureresistenz des Bacillus schuld ist, sondern dass auch die physikalischen Eigenschaften des Protoplasmas mit im Spiele sind. Vielleicht besitzt der Tuberkelbacillus überhaupt keine Hülle und besteht nur aus dem Endoplasma und Ektoplasma, wie es Pane (87) annimmt. Ferner — glaube ich — ist noch fraglich, ob die Granulasubstanz von der Zwischensubstanz chemisch differenziert ist: als Bestandteile eines sehr primitiven Organismus müssen die Granula eigentlich mit dem übrigen Protoplasma chemisch identisch sein. Für diese Identität sprechen die Befunde von Aronson (3), die Krylow (61) vollständig bestätigt hat: die Granulasubstanz ist mit denselben Reagenzien extrahierbar, mit welchen die Zwischensubstanz sich extrahieren lässt. Was nun die grosse Affinität der Körnchen zu Methylviolett, wie auch zu anderen Verbindungen dieses Pararosani-

lins betrifft, so glaube ich dafür vielleicht das Jod, das bei der Gram-Methode zur Verwendung kommt, verantwortlich machen zu können; denn behandelt man ein mit Karbolfuchsin gefärbtes Präparat vor der Entfärbung mit Lugol'scher Lösung, so wandeln sich die homogenen Stäbchen teilweise in gekörnte um. Jedoch lässt sich nicht bestreiten, dass die Körnchen sich mit Vorliebe nach Gram färben; ob alle — erscheint mir fraglich, denn in den mit der Knoll-Methode gefärbten Präparaten sah ich oft in einem und demselben Bacillus rote und violette Granula. Ich gebe zu, dass diese roten Granula bei der Umfärbung nach Gram das Metylviolett aufgenommen haben können, bemerkenswert erscheint aber, dass sie aus dem Gemische von Karbolfuchsin und Methylviolett gerade das erste wählten.

Andererseits gibt es aber Körnchen, die sich nur mit der modifizierten Gram-Methode darstellen lassen. Dies sind die Granula, die in Form von Körnerreihen und wahrscheinlich auch isoliert auftreten. Jedoch sind zur «granulären» Form des Tuberkulosevirus nur die ersten zu rechnen, wie ich oben ausgeführt habe. Die Existenz dieser Form ist zweifellos von Much zuerst nachgewiesen worden. «Praktisch brauchbare Konsequenzen» lassen sich aber aus dieser Entdeckung nicht ziehen, da solche Körnerreihen nur dort auftreten, wo auch die vollwertigen Stäbchen zu finden sind.

Somit bleibt — jetzt wie früher — der Tierversuch allein in zweifelhaften Fällen für die Diagnose der Tuberkulose massgebend.

Zusammenfassung.

Die Methode von Ziehl-Neelsen ist der Sicherheit und der Einfachheit des Verfahrens wegen am besten für die Untersuchung des tuberkulösen Materials geeignet.

Die Methode von Herman ist der Ziehl-Methode bei der Untersuchung von Sputis gleichwertig; sie übertrifft unter Umständen dieselbe bei der Untersuchung von Schnittpräparaten,

besonders wenn nach der Ziehl-Methode bei 37° gefärbt wird. Das Verfahren selbst ist jedoch etwas umständlicher.

Die von Much modifizierte Gram-Methode ist nicht imstande, allein die Diagnose «Tuberkulose» zu stellen, wenn sie auch Formen zu Gesicht bringt, die sich nach Ziehl nicht darstellen lassen. Das Verfahren ist sehr umständlich.

Die Methode von Knoll eignet sich nur zum Studium der feineren Struktur des Bacillus.

Die Körnchen im Bacillenleib stellen Anhäufungen von Chromatin dar und spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle im Leben des Bacillus unter für diesen ungünstigen Verhältnissen.

Die Körnchenreihen stellen Stäbchen dar, deren Grundsubstanz die Färbbarkeit verloren hat. Ihre Virulenz ist abgeschwächt. Unter Umständen können sie sich zu vollwertigen Stäbchen regenerieren.

Die isolierten Granula stellen abgestorbene Gebilde dar.

Zum Schlusse meiner Arbeit erfülle ich die angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. R. Stähelin, für die Anregung zu dieser Arbeit und für die während der Arbeit erteilten Ratschläge, sowie für die gütigste Gewährung der Laboratoriumshilfsmittel, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Hedinger, und dem Herrn Dozenten Dr. J. L. Burckhardt für die gütige Ueberlassung des Leichenmaterials, und meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Egger, für die liebenswürdige Erlaubnis der Benützung der Bibliothek meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

—

Literaturverzeichnis.

1. **Adam, J.,** Ueber einige neue Tuberkelbacillenfärbemethoden (Inaug. Diss. Leipzig 1910).
2. **Amann, J.,** Die feinere Struktur des Tuberkelpilzes (Schweizerische Wochenschr. f. Pharmacie) (Ref. im Centralbl. für Bakteriologie etc. Bd. 2, S. 24).
3. **Aronson, H.,** Zur Biologie der Tuberkelbacillen (Berl. Klin. Wochenschr. 1910, Nr. 35, S. 1617.)
4. **Drs,** Ueber einige strittige Punkte in der Biologie des Tuberkelbacillus (Ebenda, Nr. 35, S. 2022).
5. **D'Arrigo,** Ueber die Gegenwart und über die Phasen des Kochschen Bacillus in den sogenannten scrophulösen Lymphdrüsen (Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 28, S. 481).
6. **Babes,** Beobachtungen über die metachromatischen Körperchen Sporenbildung, Verzweigung, Kolben- und Kapselbildung pathogener Bakterien. (Zeitschr. f. Hygiene etc. Bd. 20, S. 412.)
7. **Baumgarten,** Lehrbuch der pathologischen Mykologie 1890, T. II, S. 545.
8. **v. Behring,** Ein Beitrag zur Lehre von den Infektionswegen der Tuberkulose (Tuberkulosis 1907, Vol. VI, S. 423).
9. **Berger, Karl,** Vergleichende färberische Nachprüfungen der von Ziehl-Neelsen, Much und Gasis empfohlenen Färbemethoden für Tuberkelbacillen und einige Versuche über Umfärbungen bereits gefärbter Bacillen. (Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 53, S. 174.)
10. **Berka,** Ueber das Verhältnis der zur Darstellung gelangten Tuberkelbacillen bei Sputumfärbemethoden. (Centralblatt für Bakteriol. etc. Orig. Bd. 51, S. 456.)
11. **v. Betegh,** Neue differentialdiagnostische Färbemethode für Tuberkel-, Perlsucht und andere säurefesten Bacillen nebst Strukturstudien bei verschiedenen säurefesten Bakterienarten (Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 47, S. 654.)
12. **Drs.,** Ueber eine neue Methode zur Darstellung der Tuberkelbacillensporen. (Ebenda, Orig. Bd. 49, S. 461.)
13. **Drs.,** Ueber eine neue Methode zur Darstellung der Sporen und Struktur bei den säurefesten Bakterien. (Ebenda, Orig. Bd. 52, S. 550.)
14. **Drs.,** Studien über experimentelle Tuberkulose der Meerfische. IV. Mitteilung. (Ebenda, Orig. Bd. 58, S. 495.)

15. **Biedert und Siegel**, Chronische Lungenentzündung, Phtise und miliare Tuberkulose (Virchow's Archiv 1884, Bd. XCVIII, S. 91).

16. **Bittrolff** und Momose, Zur Frage des granulären Tuberkulosevirus. (Deutsche Med. Wochenschr. 1912, Nr. 1, S. 16.)

17. **Bœm, J.**, Ueber die verschiedenen Färbemethoden der Tuberkelbacillen und deren kritische Recension. (Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 62, S. 404.)

18. **Bongert**, Bakteriol. Diagnostik für Tierärzte und Studierende 1904. (Citiert nach Berger, Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 53, S. 174.)

19. **Bunge und Trautenroth**, Smegma- und Tuberkelbacillen. (Fortschritte d. Medizin, Bd. XIV, SS. 889 u. 929.)

20. **Caan, A.**, Vergleichende Untersuchungen über neuere Methoden der Tuberkelpilzfärbung. (Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 49, S. 637.)

21. **Constantini**, Färbung der Tuberkelbacillen nach Much. (Reform. med. Nr. 41.) (Ref. in Deutsch. Med. Wochenschr. 1912, Nr. 45, S. 2137.)

22. **Coppen Jones**, Ueber die Morphologie und systematische Stellung des Tuberkelpilzes und über die Kolbenbildung bei Aktinomycose und Tuberkulose. (Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 17, S. 1.)

23. **Cornet**, Die Tuberkulose. (Spezielle Pathologie und Therapie von Nothnagel Bd. 14, Teil III, S. 15.)

24. **Drs. und Meyer**, Tuberkulose. (Handbuch der pathog. Mikro-Organismen von Kolle-Wassermann Bd. 2, S. 78.)

25. **Cornil und Babes**, Les Bakteries et leur rôle dans l'Anatomie et l'Hystologie pathologiques des maladies infectieuses. Paris 1885, S. 582 ff.

26. **Czapleysky, E.**, Die Untersuchung des Auswurfs auf Tuberkelbacillen. Jena 1891 (zitiert nach Coppen Jones, Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 17, S. 1.)

27. **Deycke**, Zur Biochemie der Tuberkelbacillen. (Münch. Med. Wochenschr. 1910, Nr. 12, S. 636.)

28. **Drs. und Much**, Einige strittige Punkte in der Biologie der Tuberkelbacillen. (Berl. Klin. Wochenschr. 1910. Nr. 42, S. 1933.)

29. **Dold**, Ueber neuere Methoden der Färbung des Tuberkelbacillus mit besonderer Berücksichtigung ihrer differentialdiagnosti-

schen Bedeutung. (Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 1911, Bd. 36, S. 433.)

30. **Eisenberg, Ph.**, Ueber neue Methoden der Tuberkelbacillenfärbung. (Berl. Klin. Wochenschr. 1910, Nr. 8, S. 338.)

31. **Ernst, P.**, Ueber Kern- und Sporenbildung in Bakterien. (Zeitschr. f. Hyg. 1889, S. 428.)

32. **Feinberg**, Ueber den Bau der Bakterien. (Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 27, S. 422.)

33. **Flügge**, Die Mikroorganismen. Leipzig 1896. Teil I. S. 64 und 76, Teil II. S. 481.

34. **Fontes**, Untersuchungen über die chemische Natur der den Tuberkelbacillen eigenen Fett- und Wachsarten und über das Phänomen der Säureresistenz. Differentialdiagnose der Tuberkel- und Pseudotuberkelbacillen. (Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 49, S. 317.)

35. **Frei, W.**, Ueber einige Anreicherungs- und Färbemethoden der Tuberkelbacillen in Sputum. (Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 61, S. 411.)

36. **Fuchs-Wolfring**, Die Much'schen «Granula» und die Carl Spenglerschen «Splitter». (Beitr. zur Klin. d. Tuberkulose Bd. X, S. 175.)

37. **Galli-Valerio**, Etudes sur les actinomycètes. (Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 63, S. 555.)

38. **Gasis**, Ueber eine neue Reaktion der Tuberkelbacillen und eine darauf begründete differential-diagnostische Färbungsmethode derselben. (Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 50, S. 111.)

39. **Drs.**, Weitere Erfahrungen über meine Methode der Tuberkelbacillenfärbung. (Berl. Klin. Wochenschr. 1910, Nr. 31, S. 1449.)

40. **Geipel**, Ein Beitrag zum Vorkommen des Tuberkelbacillus im Gewebe sowie zur Aenderung seiner Säurefestigkeit. (Beiträge zur Klin. d. Tuberkul. Bd. 17, S. 51.)

41. **Gram**, Ueber die isolierte Färbung der Schisomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. (Fortschr. d. Medizin, Bd. 2, S. 185.)

42. **Grimme**, Die wichtigen Methoden der Bakterienfärbung in ihrer Wirkung auf die Membran, den Protoplasten und die Einschlüsse der Bakterienzelle. (Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 32, S. 1.)

43. **Günther**, Einführung in das Studium der Bakteriologie. Leipzig 1895. S. 252 und 256.

44. **Hatano,** Versuche über die zuverlässige Färbung der Tuberkelbacillen. (Beitr. zur Klin. d. Tuberkulose, Bd. 16, S. 55.)

45. **Drs.,** Ueber kombinierte Färbungsmethoden für Tuberkelbacillen. (Berl. Klin. Wochenschr. 1003, Nr. 37, S. 1694.)

46. **Herman,** Procédé rapide de coloration du bacille tuberculeux dans les liquides et les tissus organiques. (Annal. de l'Institut Pasteur, T. III, S. 160.)

47. **Drs.,** Sur la coloration du bacille tuberculeux. (Ebenda T. XXII, S. 92.)

48. **Drs.,** Sur la coloration du bacille tuberculeux. (Centralbl. für Bakteriol. etc. Orig. Bd. 60, S. 600.)

49. **Kayser, A.,** Vergleichende Untersuchungen mit neueren Methoden des Tuberkelbacillennachweises. (Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 55, S. 91.)

50. **Kitasato,** Gewinnung der Tuberkelbacillen und anderer pathogenen Bakterien aus Sputum. (Zeitschr. f. Hygiene, Bd. XI, S. 441.)

51. **Kirchenstein,** Ein Beitrag zur Sporenfrage und Sporenfärbung der Tuberkelbacillen. (Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 66, S. 144.)

52. **Kitt,** Bakterienkunde und pathologische Mikroskopie, 1903. (Citiert nach Berger im Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 53, S. 174.)

53. **Knoll, W.,** Morphologisches und Biologisches über mit Methylviolett-Fuchsin gefärbten Tuberkulosevirus. (Beitr. zur Klin. d. Tuberkulose, Bd. XV.)

54. **Drs.,** Warum ist es berechtigt, der granulären Form des Tuberkulosevirus Sporencharakter zuzuschreiben? (Correspond.-Blatt f. Schweizer Aerzte, 1911, Bd. 41, S. 49.)

55. **Drs.,** «Säurefest» und «Antiforminfest» (Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 61, S. 605.)

56. **Drs.** Morphologische Beiträge zu den Beziehungen zwischen Organismus und Tuberkuloseerreger. Leipzig, bei Vogel, 1912.

57. **Koch,** Die Aetiologie der Tuberkulose. (Mitteil. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. II, S. 1.)

58. **Kolle und Hetsch,** Die experimentelle Bakteriologie und die Infektionskrankheiten. 1908.

59. **Körber, N.,** Beitrag zur klinischen Bedeutung der Much'schen Granula. (Deutsche Medizin. Wochenschr., 1912, S. 1494.)

60. **Kraus und Hofer,** Ueber Auflösung von Tuberkelbacillen im Peritoneum gesunder und tuberkulöser Meerschweinchen. (Deutsche Medizin. Wochenschr., 1912, Nr. 26, S. 1227.)

61. **Krylow**, Ueber die Bedeutung und das Vorkommen der Much-schen Granula. (Zeitschr. f. Hygiene etc. Bd. 70, S. 135.)

62. **Leschke, E.**, Ueber die granuläre Form des Tuberkulosevirus. (Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig.-Bd. 59, S. 364.)

63. **Levy, E.**, Zur Morphologie und Biologie des Tuberkelbacillus. (Zeitschr. f. klin. Medizin, Bd. 55, S. 164.)

64. **Lichtenhahn, F.**, Die neuere Forschung über die körnige Form des Tuberkuloseerregers. (Korresp.-Bl. für Schweizer Aerzte, 1910, Nr. 33, S. 1109.)

65. **Liebermeister**, Ueber die nach Ziehl nicht darstellbare Form des Tuberkelbacillus. (Deutsche Medizin. Wochenschr., 1909, Nr. 28, S. 1224.)

66. **Lier, W.**, Ein Beitrag zum Nachweis des Tuberkelbacillus im Gewebe. (Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 51, S. 678.)

67. **Löffelmann, H.**, Ueber Befunde bei Morbus Hodgkin mittelst der Antiforminmethode. (Beiträge zur Klinik der Tuberkulose, Bd. XXIV, S. 367.).

68. **Maffucci**, Die Hühnertuberkulose. (Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 11, S. 445.)

69. **Marmann**, Beiträge zur Bedeutung der Much'schen Granula im Sputum Tuberkulöser. (Archiv f. Hygiene, Bd. 76, S. 245.)

70. **Marmorek, A.**, Beitrag zur Kenntnis der Kultur und Färbung der Tuberkelbacillen. (Zeitschr. für Tuberkulose, Bd. 1, S. 444.)

71. **Marpmann**, Zur Morphologie und Biologie des Tuberkelbacillus. Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 22, S. 582.)

72. **Matson, Ralf**, Der Vergleichswert einiger neuer Methoden der Sputumuntersuchung auf Tuberkelbacillen des Ziehl'schen und Much'schen Typus. (Beitr. zur Klin. d. Tuberkul., Bd. XXIV, S. 193.)

73. **Metschnikoff**, Ueber die phagocytäre Rolle der Tuberkelriesenzellen (Virchow's Archiv, Bd. 113, S. 63.)

74. **Michaelides, N.**, Ueber eine durch die Ziehlfärbung nicht darstellbare Form des Tuberkelbacillus. (Beitr. zur Klinik d. Tuberkul., Bd. 8, S. 80.)

75. **Much, H.**, Die granuläre nach Ziehl nicht färbbare Form des Tuberkulosevirus. (Beitr. zur Klin. d. Tuberkul., Bd. 8, S. 85.)

76. **Drs.**, Ueber die nicht säurefesten Formen des Koch'schen Tuberkelbacillus. (Ebenda, S. 357.)

77. **Drs.**, Die nach Ziehl nicht darstellbare Form des Tuberkelbacillus. (Berl. Klin. Wochenschr. 1908, Nr. 14, S. 691.)

78. **Drs.,** Granula und Splitter. Eine Entgegnung auf den Artikel von Sophie Fuchs-Wolfring: Die Much'schen «Granula» und die Carl Spengler'schen «Splitter». (Beitr. z. Klin. d. Tuberkul., Bd. 11, S. 67.)

79. **Drs.,** Welche Erkenntnisse wurden durch die Entdeckung der granulären Form des Tuberkulosevirus bisher gewonnen (Monatshefte f. praktische Dermatologie, Unna Festschrift 1910, Bd. 2, S. 95.)

80. **Münch, A.,** Zum Nachweis von Tuberkelbacillen (Korresp.-Bl. f. Schweizer Aerzte 1910, S. 151.)

81. **Nakanishi.,** Ueber den Bau der Bakterien. (Centralbl. f. Bakteriol. Orig. Bd. 30, S. 155.)

82. **Neisser,** Versuche über die Sporenbildung bei Xerosebacillen, Streptokokken und Choleraspirillen. (Zeitschr. f. Hygiene, Bd. IV, S. 165.)

83. **Neumann, U. und Matson, Ralf,** Ueber Lungentuberkulose-Formen mit ausschliesslichem Vorkommen Much'scher Granula. (Beitr. z. Klin. d. Tuberkul., Bd. 24, S. 79.)

84. **v. Niessen,** Ein Protest gegen Koch's Tuberkulosierung. (Wiener Med. Wochenschr. 1902, Nr. 5, S. 215.)

85. **Drs.,** Verteidigung meines Protestes gegen Koch's Tuberkulosierung gegenüber Carl Spengler's Angriffen. (Ebenda Nr. 30, s. 1444 und Nr. 31, S. 1495.)

86. **Nocard und Roux,** Sur la culture du bacille de la tuberculose. (Annal. de l'Institut Pasteur, T. 1, S. 24.)

87. **Pane,** La morphologia e la posizione del Bacillo tubercolare. (Ref. in Centralbl. f. Bakteriol. etc. Bd. 42, S. 10.)

88. **Pekanovitsch,** Die Much'sche Form des Tuberkelbacillus (Orvosi Hetilap, Nr. 51 und 52). (Ref. in Deutsch. Med. Wochenschr. 1912, Nr. 7, S. 330.)

89. **Piery und Mandone,** Polymorphisme du Bacille de Koch dans les produits de l'expectoration des phtisiques. (Comptes rendus hebdomadaires des séances de la société de Biologie T. 56, S. 586.)

90. **Popoff-Tscherkasky,** Comparaison de quelques nouvelles méthodes de coloration de Mycobacterium tuberkulosis. Thèse de Lausanne 1911.

91. **Rabinovitsch, L.,** Experimentelle Untersuchungen über die Virulenz latenter tuberkulöser Herde. (Zeitschr. f. Tuberkulose, Bd. 15, S. 217.)

92. **Dies.**, Zur Frage latenter Tuberkelbacillen. (Berl. Klin. Wochenschr. 1907, Nr. 2, S. 35.)

93. **Rosenblat, St.**, Ueber die granuläre Form der Tuberkelbacillen im Sputum. (Münch. Med. Wochenschr. 1909 Nr. 40, S. 2521.)

94. **Rosenblat, S.**, Vergleichende Untersuchungen über neuere Färbungsmethoden der Tuberkelbacillen, nebst einem Beitrag zur Morphologie dieser Mikroorganismen. (Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 58. S. 173.)

95. **Sander**, Ueber das Wachstum von Tuberkelbacillen auf pflanzlichen Nährböden. (Archiv f. Hygiene etc., Bd. 16, S. 238.)

96. **Schmorl**, Untersuchungsmethoden. Leipzig 1901.

97. **Schottmüller**, Ueber die klinische Bedeutung der nicht nach Ziehl, sondern nach Gram färbbaren Wuchsformen des Tuberkulosevirus. (Münch. Med. Wochenschr. 1908, Nr. 49, S. 2564.)

98. **v. Schroen**, Ueber Tuberkelbacillen und die Tuberkelsporen. (Tagebl. d. 59. Vers. der Naturforscher und Aerzte, 1886, S. 144.)

99. **Schultz, Ed.**, Ueber die granuläre Form des Tuberkulosevirus im Lungenauswurf. (Deutsche Med. Wochenschr. 1909, Nr. 36, S. 1569.)

100. **Sciallero und Marzagalli**, Sul valore diagnostico della presenza di granuli acido resistenti nell' espettorato. (Annal. dell' Istit. Maragliano, Vol. 3, S. 131.) (Ref. in Centralbl. f. Bakteriol. etc. Ref. Bd. 45, S. 285.)

101. **Spengler, C.**, Ueber das Koch'sche Tuberkulin und Tuberkelbacillensplitter. Eine Kritik des v. Niessen'schen «Protestes gegen Koch's Tuberkulosierung». (Wiener Medizin. Wochenschr. 1902, Nr. 14, S. 658.)

102. **Drs.**, Tuberkelbacillenzüchtung aus Bakteriengemischen und Formaldehyddesinfektion. (Zeitschr. f. Hygiene, etc., Bd. 42, S. 90.)

103. **Drs.**, Ueber Splittersputa Tuberkulöser. (Ebenda, Bd. 49, S. 541.)

104. **Drs.**, Neue Färbemethoden für Perlsucht- und Tuberkelbacillen und deren Differentialdiagnose (Deutsche mediz. Wochenschr. 1907, Nr. 9, S. 337.)

105. **Stephan**, Ueber eine besonders für Schnittfärbungen brauchbare Modifikation der Gram'schen Färbungsmethode. (Centralbl. f. Bakteriol. etc. Orig. Bd. 51, S. 94.)

106. **Telemann**, Tuberkelbacillennachweis. (Deutsche Med. Wochenschr. 1910, S. 891.)

107. **Treuholz, C. A.**, Forms of Tubercle bacilli which cannot be colored by Ziehl-Neelsen stain. (Medical Record. Vol. 73, S. 60.) (Ref. im Centralbl. f. Bakteriol. etc., Ref. Bd. 42, S. 77.)

108. **Unna**, Die feinere Struktur des Leprabacillus. (Autorreferat in den Monatsheften f. praktische Dermatologie 1886, S. 404.)

109. **Vœlsch, M.**, Beitrag zur Frage nach der Tenacität der Tuberkelbacillen. Inaug.-Diss. Königsberg 1887.

110. **Wegelin, C.**, Ueber den Tuberkelbacillengehalt verkalkter Herde. (Korresp.-Bl. f. Schweizer Aerzte 1910, S. 913.)

111. **Wehrli und Knoll**, Ueber die nach Ziehl nicht färbbare granuläre Form des Tuberkulosevirus. (Beiträge z. Klin. d. Tuberkulose, Bd. 14, S. 135.)

112. **Weihrauch**, K., Beitrag zur Färbung der Tuberkelbacillen und Granula im Sputum. (Zeitschr. f. Tuberkul., Bd. 14, S. 511.)

113. **Weiss, L.**, Ueber den Gehalt käsig kreidiger Lymphdrüsen an Tuberkelbacillen. (Münch. Med. Wochenschr. 1909, Nr. 9, S. 443).

114. **Drs.**, Zur Morphologie des Tuberkulosevirus unter besonderer Berücksichtigung einer Doppelfärbung. (Berl. Klin. Wochenschr. 1909, S. 1797.)

115. **Wesener**, Ueber das Vorkommen der Tuberkelbacillen in den Organen Tuberkulöser. (Deutsches Archiv f. klinische Medizin Bd. 34, S. 583.)

116. **Wirths, M.**, Ueber die Much'sche granuläre Form des Tuberkulosevirus. (München. Med. Wochenschr. 1908, Nr. 32, S. 1687.)

117. **Drs.**, Die Much'schen «Granula» und die Carl Spengler'schen «Splitter». (Beitr. zur Klinik d. Tuberkul. Bd. 11, S. 73.)

118. **Wolff, P.**, Ueber latentes Vorkommen der Much'schen Form des Tuberkelbacillus. (Münch. Med. Wochenschr. 1909, S. 2312.)

119. **Ziehl**, Zur Lehre von den Tuberkelbacillen, insbesondere über deren Bedeutung für Diagnose und Prognose. (Deutsche med. Wochenschr. 1883, Nr. 5, S. 62.)